

**Adenosinrezeptoren auf humanen
T-Lymphozyten:
Modulation durch Subtyp-selektive Rezeptor-
Agonisten und -Antagonisten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Svenja K. Lacher

aus

Villingen-Schwenningen

Bonn 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Referent: Prof. Dr. Gerd Bendas
3. Referent: Prof. Dr. Gabriele König
4. Referent: Prof. Dr. Hanns Häberlein

Tag der Promotion: 20. März 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn <http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss-online> elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis Dezember 2008 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, die mir durch ihre Unterstützung die erfolgreiche Absolvierung des Qualifizierungsjahres für Fachhochschulabsolventen ermöglicht hat, und mir dadurch die Möglichkeit bot, diese Arbeit mit der interessanten Themenstellung anzufertigen. Ich danke ihr für die stets freundliche Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates; Frau Prof. Dr. Gabriele König und Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein danke ich für die Mitwirkung in meiner Promotionskommission.

Ich danke der deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums für die Heranführung an die Doktorarbeit und eines Promotionsstipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“.

Hans-Jörg
und meiner Familie

Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.

Pierre Teilhard de Chardin (1881 – 1955)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Grundlagen des Immunsystems | 1 |
| 1.1.1 | Lymphozyten – Effektoren der adaptiven Immunantwort..... | 4 |
| 1.1.2 | Zytokine | 6 |
| 1.2 | Adenosinrezeptoren..... | 9 |
| 1.2.1 | Klassifizierung der Purinrezeptoren..... | 9 |
| 1.2.2 | Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren | 11 |
| 1.2.3 | Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren | 14 |
| 1.2.4 | G-Protein-Kopplung der Adenosinrezeptoren | 15 |
| 1.2.5 | Allgemeine physiologische Funktionen von Adenosinrezeptoren..... | 17 |
| 1.3 | Adenosinrezeptoren im Immunsystem..... | 21 |
| 1.4 | Ziele der Arbeit | 27 |
| 2 | Bestimmung der Adenosinrezeptorexpression auf humanen T-Lymphozyten | 31 |
| 2.1 | Einleitung | 31 |
| 2.2 | Bestimmung der Adenosinrezeptor-Transkripte durch Messung der mRNA mittels Real-time-PCR | 34 |
| 2.3 | Bestimmung der Adenosinrezeptorexpressionsmuster mittels Radioligand- Rezeptor-Bindungsstudien | 38 |
| 2.3.1 | Adenosinrezeptorexpression auf primären humanen T-Lymphozyten ... | 39 |
| 2.3.2 | Adenosinrezeptorexpression auf Jurkat T-Zellen | 49 |
| 2.3.3 | Bestimmung der Affinitäten verschiedener Adenosinrezeptorliganden an Jurkat T-Zellen | 55 |
| 2.4 | Rezeptoroligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren..... | 64 |
| 2.5 | Vergleich: Real-time-PCR und Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien..... | 77 |
| 2.6 | Zusammenfassung und Ausblick | 81 |
| 3 | Charakterisierung der Adenosinrezeptor-vermittelten Calcium-Signale in humanen T-Lymphozyten | 85 |
| 3.1 | Einleitung | 85 |
| 3.2 | Fluorimetrische Calciummessungen an Jurkat T-Zellen..... | 87 |
| 3.3 | Fluorimetrische Calciummessungen an primären humanen T-Lymphozyten . | 92 |
| 3.4 | Zusammenfassung und Ausblick | 97 |
| 4 | Einfluss von Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation humaner T-Lymphozyten | 99 |
| 4.1 | Einleitung | 99 |
| 4.1.1 | Proliferation humaner Lymphozyten | 99 |
| 4.1.2 | Phytohaemagglutinin (PHA)..... | 101 |
| 4.1.3 | Adenosin und T-Lymphozytenproliferation | 102 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.2 | Einfluss von Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten..... | 106 |
| 4.2.1 | Etablierung eines Assays im 96-Well-Format | 107 |
| 4.2.2 | Etablierung eines Assays im 48-Vial-Format | 108 |
| 4.2.3 | Überprüfung der Assayetablierung durch FACS-Messungen | 110 |
| 4.2.4 | Adenosinrezeptor-Agonisten | 112 |
| 4.2.5 | Adenosinrezeptor-Antagonisten..... | 116 |
| 4.2.6 | Weiterführende Untersuchungen zu den Effekten der Adenosinrezeptorliganden | 121 |
| 4.2.7 | Die Adenosindesaminase (ADA)..... | 126 |
| 4.3 | Einfluss von Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen..... | 131 |
| 4.4 | Zusammenfassung und Ausblick | 134 |
| 5 | Charakterisierung verschiedener Baldrianextrakte als Adenosinrezeptorliganden..... | 137 |
| 5.1 | Einleitung | 137 |
| 5.1.1 | [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien - Grundlagen | 143 |
| 5.2 | Interaktion verschiedener hydroalkoholischer Baldrianextrakte mit A ₁ - und A _{2A} -Adenosinrezeptoren | 145 |
| 5.2.1 | Testung der Extrakte 1-5 an A ₁ - und A _{2A} -Adenosinrezeptoren..... | 145 |
| 5.2.2 | Testung der Extrakte 6-8 an A ₁ - und A _{2A} -Adenosinrezeptoren..... | 149 |
| 5.2.3 | Testung der Extrakte 9-12 an A ₁ -Adenosinrezeptoren | 151 |
| 5.2.4 | Zusammenfassung und Diskussion | 153 |
| 5.3 | Interaktion von Baldrianextrakten unterschiedlicher Polarität mit A ₁ - und A _{2A} -Adenosinrezeptoren..... | 155 |
| 5.3.1 | Extraktionsmethoden zur Gewinnung der Baldrianextrakte | 155 |
| 5.3.2 | Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien der Baldrian-Rohextrakte an A ₁ - und A _{2A} -Adenosinrezeptoren | 157 |
| 5.3.3 | [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien der Baldrian-Rohextrakte an A ₁ -Adenosinrezeptoren | 160 |
| 5.3.4 | Bioassay-geführte Fraktionierung des Extraktes KL-B-1 | 163 |
| 5.3.5 | Zusammenfassung und Ausblick | 168 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 171 |
| 7 | Experimenteller Teil | 177 |
| 7.1 | Allgemeine Angaben..... | 177 |
| 7.1.1 | Geräte und Materialien..... | 177 |
| 7.1.2 | Chemikalien | 179 |
| 7.1.3 | Reaktionskits..... | 182 |
| 7.1.4 | Radioliganden | 182 |
| 7.1.5 | Gewebe / Zellen und deren Ursprung | 183 |
| 7.1.6 | Pufferlösungen | 184 |
| 7.2 | Zellkultur..... | 187 |
| 7.2.1 | Nährmedien für die Zellkultur | 188 |
| 7.2.2 | Isolierung humaner Lymphozyten aus „buffy coats“ | 189 |
| 7.2.3 | Auftauen von Zellen..... | 192 |
| 7.2.4 | Kultur und Splitten von Zellen..... | 192 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 7.2.5 | Erstellen von Backups / Einfrieren von Zellen | 193 |
| 7.2.6 | Stimulierung der Proliferation von Lymphozyten | 193 |
| 7.2.7 | Zellzahlbestimmung | 194 |
| 7.3 | Membranpräparationen | 195 |
| 7.3.1 | Membranpräparation von Rattenhirn-Geweben | 195 |
| 7.3.2 | Membranpräparationen von Zellen | 196 |
| 7.4 | Proteinbestimmung nach Lowry | 199 |
| 7.5 | Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien | 201 |
| 7.5.1 | Kompetitionsexperimente – Grundlagen | 201 |
| 7.5.2 | Kompetitionsexperimente – Durchführung | 202 |
| 7.5.3 | Kompetitionsexperimente an Membranpräparationen | 204 |
| 7.5.4 | Kompetitionsexperimente an intakten Zellen | 209 |
| 7.5.5 | [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien | 214 |
| 7.6 | Proliferationsassay | 217 |
| 7.6.1 | Durchführung des Proliferationsassays mit [³ H]Thymidin | 217 |
| 7.6.2 | FACS-Messungen | 219 |
| 7.7 | Real-time-PCR | 222 |
| 7.7.1 | Isolierung von RNA | 223 |
| 7.7.2 | Quantifizierung der isolierten RNA | 223 |
| 7.7.3 | Transkription der isolierten RNA in cDNA | 224 |
| 7.7.4 | Referenzgene | 224 |
| 7.7.5 | Verwendete Primer | 225 |
| 7.7.6 | Durchführung der Real-time-PCR | 226 |
| 7.7.7 | Auswertung der Real-time-PCR | 227 |
| 7.8 | Fluorimetrische Calcium-Messungen | 231 |
| 7.8.1 | Einstellungen des Gerätes FLUOStar Galaxy | 231 |
| 7.8.2 | Versuchsdurchführung: Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Freisetzung | 231 |
| 7.9 | Statistische Berechnungen | 234 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 237 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 245 |

1 Einleitung

1.1 Grundlagen des Immunsystems

Die Hauptaufgabe des menschlichen Immunsystems besteht darin, einen Organismus effektiv vor den Angriffen durch pathogene Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten zu schützen sowie veränderte körpereigene Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Dabei kann es auf vielfältige Mechanismen zurückgreifen: Es verfügt über die unspezifische, angeborene (innate) sowie die spezifische, erworbene (adaptive) Immunität.¹

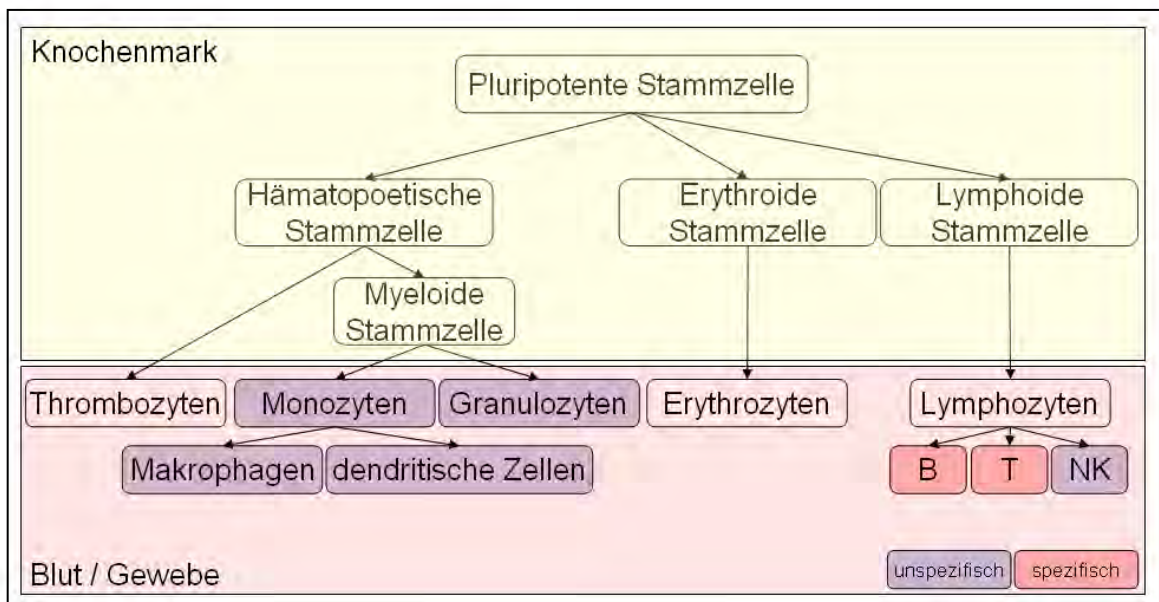


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Hämatopoese der Zellen des blutbildenden Systems

Unspezifische Abwehrmechanismen können einerseits anatomische Faktoren wie das mehrschichtige Plattenepithel der Haut oder die Blut-Hirn-Schranke sein, die für viele Erreger unüberwindlich sind. Auch spielen physikalische Faktoren wie Schleim- und Sekretfluß oder die Zilienbewegung des Flimmerepithels der Lunge eine wichtige Rolle, genauso auch biochemische (humorale) Faktoren wie ungünstige pH-Verhältnisse (z.B. der „Säureschutzmantel“ der Haut, der Schweiß- und Talgdrüsen und des Magens), Lysozym in Tränenflüssigkeit und Speichel, Defensine, Zytokine wie Interferone und

einige andere. Auch Zellen sind an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt: Haben Mikroorganismen die Epithelien der Körperoberflächen überwunden, so üben zum Beispiel polymorphkernige Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Mastzellen) sowie Monozyten (Makrophagen und dendritische Zellen) und Natürliche Killer-(NK-) Zellen die Funktion von Phagozyten aus.² Makrophagen und dendritische Zellen erkennen zusätzlich spezifisch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), eine Gruppe hoch konservierter Struktur motive, die essentiell für ein breites Spektrum an Mikroorganismen sind und es somit dem Immunsystem ermöglichen, deren Eindringen zu erkennen. Die Erkennung erfolgt über eine Gruppe von Rezeptoren, zu denen auch Toll-like-Rezeptoren gehören. Auch lösliche Faktoren, hauptsächlich Proteine wie z.B. das Komplementsystem, werden den unspezifischen Mechanismen zugeordnet. Lässt sich eine Infektion durch diese Mechanismen nicht innerhalb von Stunden eliminieren, wird die nicht-adaptive Abwehrreaktion und damit die Entzündung intensiviert. Blutgefäße werden weitgestellt (*calor* und *rubor*) und für Flüssigkeit und hochmolekulare Substanzen permeabel, sodass ein lokales Ödem entsteht (*tumor*). Dadurch bedingt werden mehr Neutrophile und weitere Immunzellen in den Infektionsherd gelockt und es werden Schmerzmediatoren ausgeschüttet (*dolor*).³ Aktivierte Makrophagen setzen Zytokine frei (die „Hormone des Immunsystems“) - wie zum Beispiel Interleukine (IL) und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , was eine weitere Aktivierung und Ausbreitung der Entzündungsreaktion zur Folge hat. Alle diese angeborenen Resistenzmechanismen stehen dem Organismus jederzeit zur Verfügung („*first line of defense*“), sehr viele Infektionen werden durch sie verhindert, sehr früh eliminiert oder stark abgeschwächt.⁴ Ist dies nicht der Fall, so wird das adaptive Immunsystem aktiviert bzw. intensiviert.

Die adaptive Immunantwort setzt mit einer Latenz ein und ist spezifisch für die Moleküle, die diese Immunantwort auslösten (Antigene). Die spezifische Infektionsabwehr setzt sich aus zwei Bereichen zusammen, der spezifischen humoralen und der spezifischen zellulären Abwehr. Rund 1 kg des Körpergewichts eines Menschen, was mehr als 10^{12} Zellen entspricht, dienen der spezifischen Abwehr körperfremder Strukturen. Diese Zellen, allesamt Abkömmlinge der pluripotenten Stammzelle (siehe **Abb. 1-1**), sind im ganzen Körper zu finden, sie sind diffus vor allem im Interstitium und Lymph- bzw. Blutkreislauf verteilt und angehäuft in bestimmten lymphatischen Organen zu finden, wie zum Beispiel dem Thymus (\rightarrow Prägungsort der T-Lymphozyten), dem Bursa-

Äquivalent im Knochenmark (→ Prägungsort der B-Lymphozyten), der Milz, den Tonsillen oder den Lymphknoten.² Dabei wird die humorale Immunantwort hauptsächlich durch Antikörper getragen, welche von B-Lymphozyten und ihren Nachkommen in die Extrazellulärflüssigkeit sezerniert werden; für die B-Zellreifung und -aktivierung werden T-Helferzellen benötigt. In den Körperflüssigkeiten befindliche Krankheitserreger und Giftstoffe werden im allgemeinen durch zirkulierende Antikörper neutralisiert, die meisten pathogenen Viren, Bakterien und Parasiten vermehren sich jedoch innerhalb von Zellen, wo sie für Antikörper nicht zugänglich sind. Intrazelluläre Infektionen werden durch die Zell-vermittelte adaptive Immunabwehr bekämpft, T-Lymphozyten sind die Effektoren dieser zellulären Immunantwort. Aus den hämatopoetischen Geweben wandern Stammzellen in den Thymus, wo sie proliferieren und sich zu sogenannten Thymozyten differenzieren. Diese durchlaufen dann weitere unterschiedliche Entwicklungsstadien im Thymus, die durch das Expressieren von Oberflächenstrukturen und das Aneignen von spezifischen molekularen Eigenschaften gut definiert sind. Eine Gruppe solcher exprimierter Oberflächenmarker sind Antigen-spezifische Rezeptoren (*T cell receptor*, TCR). Diese sind zellgebunden und erkennen als Epitope fast ausschließlich lineare Peptide, welche von anderen Zellen auf der Oberfläche aktiv durch MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle präsentiert werden.^{4,5}

Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen, MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers – allerdings in unterschiedlichem Ausmaß – exprimiert, MHC-II-Moleküle werden mit einigen Ausnahmen wie z.B. der Makrophagen-verwandten Mikroglia-Zellen im Gehirn, nur von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems exprimiert; dazu gehören dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen.

1.1.1 Lymphozyten – Effektoren der adaptiven Immunantwort

Lymphozyten zeichnen sich durch einen meist runden, recht chromatindichten Kern aus, der von einem sehr schmalen Zytoplasmasaum umgeben ist, und besitzen einen Durchmesser von ca. 4-15 μm . Etwa ein Drittel der Gesamtleukozytenzahl sind Lymphozyten,⁶ dabei machen T-Lymphozyten ca. 75% der zirkulierenden Lymphozyten aus, B-Lymphozyten 10% - 15% und NK-Zellen haben ebenfalls einen Anteil von 10% - 15%.^{6,7}

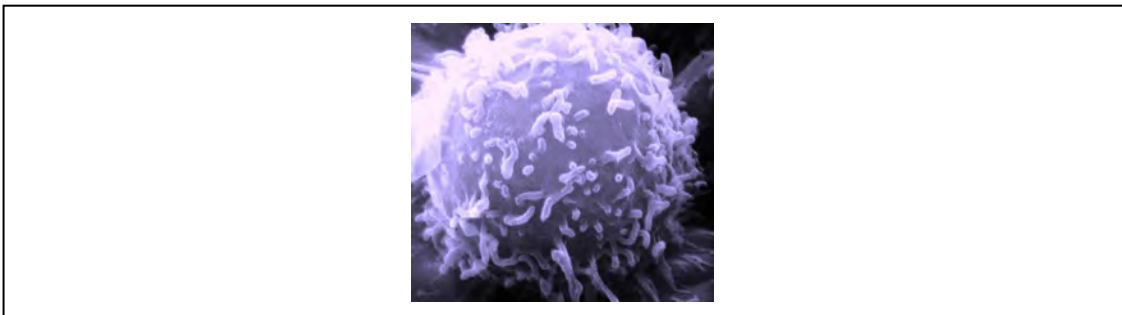


Abb. 1-2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines einzelnen humanen Lymphozyten

(<http://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=1944>, U.S. National Cancer Institute, NIH Verfügbarkeitsdatum: 01.09.2008)

Lymphozyten sind morphologisch nicht voneinander unterscheidbar, wie die anderen Zellen des Immunsystems besitzen sie jedoch charakteristische Oberflächenmoleküle (CD, *cluster of differentiation*), durch die sie sich unterscheiden lassen. So sind zum Beispiel B-Lymphozyten CD19^+ , T-Lymphozyten immer CD3^+ und können auch noch weiter in CD4^+ (T-Helfer) und CD8^+ (T-Suppressor) unterteilt werden. Dabei liegen diese beiden T-Zell-Subpopulationen in einem Mengenverhältnis von ca. 1.2:1 vor, es sind also bei einem normal gesunden Erwachsenen marginal mehr CD4^+ - als CD8^+ -T-Zellen vorhanden.⁶

Tab. 1-1: Oberflächenstruktur der Lymphozytenpopulationen

| Lymphozytenpopulation | Differenzierungsmerkmale (Auswahl) |
|--|---------------------------------------|
| NK-Zellen | CD16, CD56 |
| B-Lymphozyten | B-Zell-Rezeptor, CD19, CD20, IgM, IgD |
| T-Helfer: $\text{Th}_0 \rightarrow \text{Th}_1$ und Th_2 (\rightarrow Gedächtnis T-Lymphozyten) | T-Zell-Rezeptor, CD2, CD3, CD4 |
| Suppressor/zytotoxische T-Lymphozyten (\rightarrow Gedächtnis T-Lymphozyten) | T-Zell-Rezeptor, CD2, CD3, CD8 |

Der $CD4^+$ -T-Zell-Rezeptor kann dabei Antigene im Kontext von MHC-II-Molekülen erkennen, $CD8^+$ -T-Lymphozyten besitzen einen MHC-I-erkennenden T-Zell-Rezeptor. Naive T-Zellen zirkulieren in der Peripherie durch Blut und sekundäre lymphatische Organe in einem ruhenden Zustand, sie werden fast ausschliesslich über die Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem MHC-Antigenkomplex und einem zusätzlichen kostimulatorischen Signal über Glykoproteine wie CD28-CD80/86 aktiviert⁸ (siehe **Abb. 1-3**). Für eine vollständige Aktivierung wird zusätzlich ein Signal über Zytokine ($IFN-\gamma$) benötigt. Eine Aktivierung von T-Zellen ohne kostimulatorische Signale führt zu Apoptose oder Anergie.⁹ Eine vollständige Aktivierung der T-Zelle führt zur Oligomerisierung von T-Zellrezeptoren.¹⁰

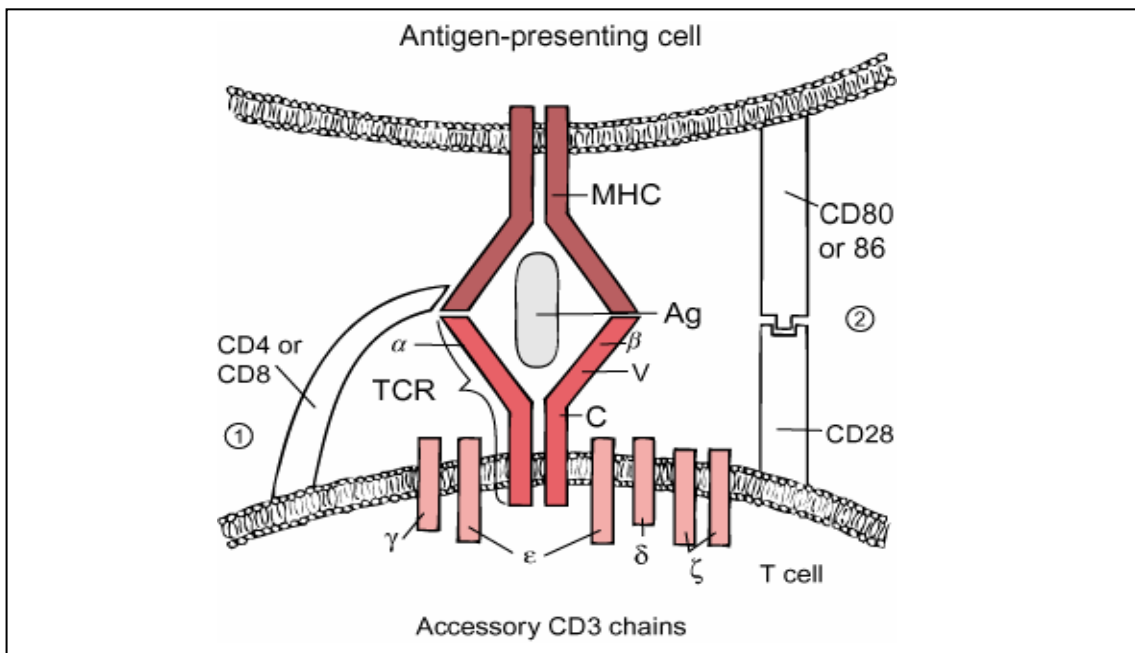


Abb. 1-3: T-Zell-Aktivierung über das Zwei-Signal-Modell

MHC: Major histocompatibility complex, **Ag:** Antigen, **TCR:** T-cell receptor, **V:** Variable Domäne des TCR, **C:** Konstante Domäne des TCR, **CD:** cluster of differentiation

Die $\alpha\beta$ -Ketten des TCR binden an den Antigen/MHC-Komplex und CD4 bzw. CD8 interagiert mit dem MHC → Stimulation der T-Zelle (1. Signal) über CD3.

Ein kostimulatorisches Signal über (Glyko-)Proteine wie CD28-CD80/86 (2. Signal) ist für eine vollständige T-Zell-Aktivierung notwendig (weitere Erklärungen im Text).

(Quelle: www.merck.com/media/mmpe/figures/figure1sec13ch163_eps.gif,
Verfügbarkeitsdatum 03.09.2008)

Der T-Zellrezeptor wird während der Ontogenese im Thymus durch eine Neukombination der Gene, die für den Rezeptor kodieren, erstellt und auf die Zelloberfläche expriert. Er besteht aus zwei Disulfid-verknüpften Polypeptidketten, α und β (95% der T-Lymphozyten)¹¹ bzw. γ und δ (1% - 3% der T-Lymphozyten).¹² $\alpha\beta$ -TCR und $\gamma\delta$ -TCR besitzen variable V-Domänen und konstante C-Domänen, wobei die V-Domänen die Antigenbindungsstellen darstellen. $\gamma\delta$ -TCR erkennen dabei keine MHC-Komplexe, sondern CD1-Oberflächenmoleküle, womit sie z.B. Viren erkennen können. Der TCR liegt immer als Komplex mit CD3 vor, wobei der TCR dabei den MHC/Antigen-Komplex erkennt. CD3 – bestehend aus sechs Untereinheiten (γ , δ , 2 x ϵ und 2 x ξ) – ist für die Weiterleitung von aktivierenden Signalen in das Zellinnere verantwortlich.¹ Die Interaktion des TCR mit dem MHC-Komplex wird im Wesentlichen durch drei Faktoren bestimmt: 1.) die TCR-Dichte auf der T-Zell-Membran, 2.) die Dichte von MHC/Antigen-Komplexen auf der Antigen-präsentierenden Zelle und 3.) die Affinität des TCR für den MHC/Antigen-Komplex.

1.1.2 Zytokine

Als Zytokine bezeichnet man eine Gruppe kleinerer, ca. 25 kDa schwerer Proteine unterschiedlichster Struktur und Funktion, die von verschiedenen Zellen des Körpers, unter anderem von den Zellen des Immunsystems, gebildet und abgegeben werden, meist infolge eines aktivierenden Stimulus. Sie vermitteln dabei ihre Wirkungen über eine Bindung an spezifische Rezeptoren, sogenannte Zytokinrezeptoren,¹ die Wirkungen können dabei sowohl autokrin als auch parakrin sein, d.h. die Zellen beeinflussen mit der Zytokinausschüttung entweder sich selbst oder benachbarte Zellen. Manche Zytokine sind so stabil und haben die Fähigkeit in den (Blut-)Kreislauf zu gelangen und haben dort auch eine ausreichend große Halbwertszeit, dass sie endokrine Fähigkeiten besitzen und somit auch auf Zellen wirken können, die weiter entfernt lokalisiert sind. Die meisten Zytokine haben dabei eine Vielzahl biologischer Effekte, sie können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen besitzen und sind in Prozesse wie zum Beispiel Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und Zellproliferation involviert, dienen also als

Wachstumsfaktoren oder Mediatoren. Pro- und antiinflammatorisch wirksame Zytokine liegen normalerweise in einem Gleichgewicht vor, eine Störung dieses Gleichgewichtes kann schwerwiegende Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose zur Folge haben.

Zytokine können in fünf Hauptgruppen unterteilt werden: Interferone (IFN), Interleukine (IL), koloniestimulierende Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine. Wichtige Vertreter der proinflammatorischen Zytokine sind TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, M-CSF (Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) und GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor); antiinflammatorisch wirken zum Beispiel IL-10 und TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor- β).¹ Eine Auswahl wichtiger Zytokine und ihrer Hauptfunktionen ist in **Tabelle 1-2** dargestellt.

Lymphozyten üben eine Vielzahl ihrer Funktionen erst durch Anregung von Zytokinen oder über die eigene Ausschüttung von Zytokinen aus. So sezernieren die unterschiedlichen T-Helferzellen zum Beispiel ein jeweils charakteristisches Zytokin-Profil, Th₁-Zellen geben unter anderem hauptsächlich IL-2, TNF- β und IFN- γ , jedoch wenig IL-4 und IL-5 ab. Im Gegensatz dazu geben Th₂-Zellen hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 ab.^{13,14} Auch die T-Zell-Ontogenese im Thymus und damit die Differenzierung und Prägung in die einzelnen T-Zell-Subklassen (CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ CD4⁻CD8⁻) wird über Zytokine gesteuert.¹

Tab. 1-2: Zytokine (Auswahl), sezernierende Zellen und Haupteffekte (nach¹⁾)

| Zytokin | Hauptquelle | Haupteffekte |
|-------------------------|--|--|
| IL-1 (α/β) | Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen | Fieber, induziert akute Phaseproteine Makrophagen-, T-, B-Zell-Aktivierung |
| IL-2 | Th ₁ | T-, B-Zell-Proliferation |
| IL-3 | T-Zellen, thymische Epithelzellen | Synergistische Effekte in der frühen Häma- topoese |
| IL-4 | T-Zellen, Mastzellen | B-Zell-Aktivierung, induziert Produktion von IgE (Isotype switch) induziert Differenzierung von Th ₂ |
| IL-5 | T-Zellen, Mastzellen | Wachstum und Differenzierung von Eosi- nophilen IgA-Sekretion ↑ |
| IL-6 | T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen | T-, B-Zell-Wachstum u. Differenzierung, Fieber, induziert akute Phaseproteine |
| IL-7 | Nicht-T-Zellen | Prä-B- und Prä-T-Zell-Wachstum |
| IL-10 | Makrophagen, T-Zellen | Makrophagen-Suppression Immunregulation |
| IL-12 | Makrophagen, dendritische Zellen | NK-Zell- Aktivierung, induziert Differenzierung von Th ₁ |
| IL-13 | T-Zellen | B-Zell-Wachstum, Th ₁ -Zell-Suppression, Ausschüttung proinflammatorischer Zytoki- ne durch Makrophagen ↓ |
| IFN- γ | T-Zellen, NK-Zellen | Makrophagen-Aktivierung, MHC-Expression ↑, Inhibition von Th ₂ -Differenzierung |
| GM-CSF | Monozyten, Makrophagen, T-Zellen | Bildung von Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen |
| M-CSF | Monozyten, Makrophagen | Wachstum und Differenzierung der myeloi- den Stammzellen |
| TNF- α | Monozyten, Makrophagen T-Zellen, NK-Zellen | Lokale Entzündung, Endothelaktivierung |
| TGF- β | Monozyten, T-Zellen | B-Zell-Proliferation ↓ induziert Produktion von IgA (Isotype switch) |

1.2 Adenosinrezeptoren

1.2.1 Klassifizierung der Purinrezeptoren

Bereits 1929 wurde Adenosin die Fähigkeit zugeschrieben, als extrazelluläres Signalmolekül zu fungieren.¹⁵ Adenosin ist im Körper sehr weit verbreitet und an einer Vielzahl physiologischer Effekte beteiligt, wobei diese hauptsächlich über die Aktivierung von Adenosinrezeptoren (AR) vermittelt werden.¹⁶ Burnstock schlug 1978 die Unterscheidung von Purinrezeptoren in P1-Rezeptoren mit Adenosin als endogenem Liganden und in P2-Rezeptoren mit den Purinnukleotid-Liganden Adenosin-5'-diphosphat (ADP) bzw. Adenosin-5'-triphosphat (ATP) vor.¹⁷

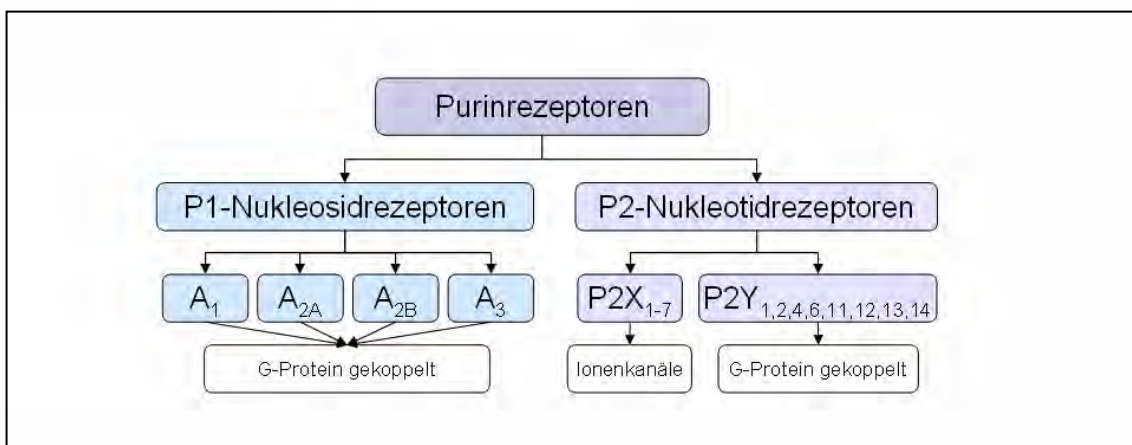


Abb. 1-4: Einteilung der Purin- und Pyrimidinrezeptoren

Heute sind vier verschiedene Subtypen von P1- oder Adenosinrezeptoren bekannt, die als A_1 (A_1AR), A_{2A} ($A_{2A}AR$), A_{2B} ($A_{2B}AR$) und A_3 (A_3AR) bezeichnet werden.¹⁶ Bereits 1979 wurden A_1 - von A_2 -Adenosinrezeptoren aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungen auf die Adenylatcyclase unterschieden,¹⁸ 1983 wurden dann die A_2 -Adenosinrezeptoren weiter in die hochaffinen A_{2A} - und die niedrigaffinen A_{2B} -Subtypen unterteilt.¹⁹ Der letzte Subtyp, der A_3 -Adenosinrezeptor, konnte im Jahr 1992 identifiziert werden.²⁰ P2-Nukleotidrezeptoren können weiter in die Ligand-gesteuerten Ionenkanäle, die P2X-Rezeptoren, und in die G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren unterteilt werden. Bislang sind sieben P2X-Rezeptor-Untereinheiten ($P2X_1$ bis $P2X_7$)

und acht P2Y-Rezeptor-Subtypen (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄) identifiziert.²¹⁻²³ Während bei den P1-Rezeptoren Adenosin der einzige bekannte physiologische Agonist ist, können an den P2Y-Rezeptoren eine Vielzahl von endogenen Nukleotiden wie zum Beispiel ADP, ATP, UDP, UTP und UDP-Glukose aktivierend angreifen. Erst kürzlich konnten Rezeptoren für die Purinbase Adenin identifiziert und kloniert werden, die sich ebenfalls in die Gruppe der Purin-Rezeptoren einordnen lassen,^{24,25} sie wurden von Brunschweiler und Müller als P0-Rezeptoren bezeichnet.²⁶

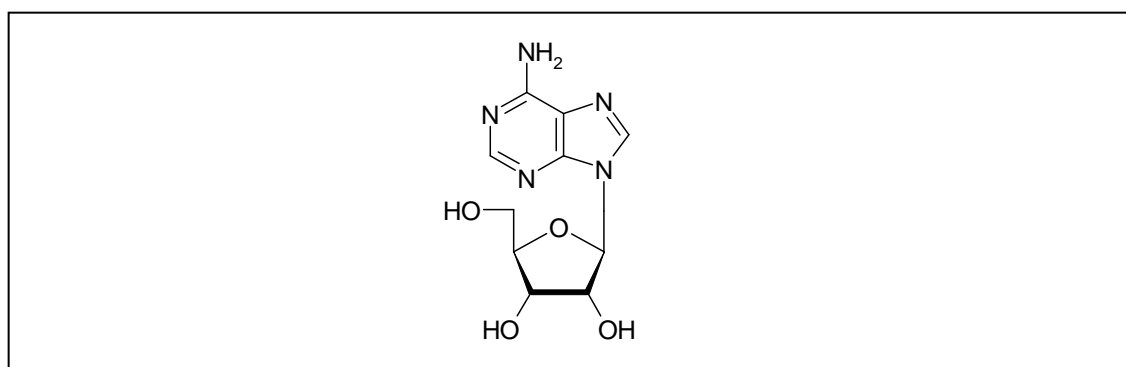


Abb. 1-5: Chemische Struktur von Adenosin, dem endogenen Agonisten der Adenosinrezeptoren

Adenosinrezeptoren sind im Hinblick auf Aminosäuresequenz, Rezeptoraffinität selektiver Liganden, Second-Messenger-gekoppelte Signaltransduktionswege und Verteilung im Organismus vergleichsweise gut charakterisiert. Native Ratten-A₁- und -A_{2A}-Adenosinrezeptoren zeigen relativ hohe Affinitäten für Adenosin im mittleren nanomolaren Bereich (EC₅₀-Werte von 10-70 nM bzw. 30-150 nM), wohingegen native Ratten-A_{2B}- und -A₃-Adenosinrezeptoren geringere Affinitäten für Adenosin im mikromolaren Bereich (EC₅₀-Werte von 5.000 nM bzw. 6.000-30.000 nM) aufweisen.^{20,27-29} In künstlichen Systemen, wie zum Beispiel rekombinanten humanen Adenosinrezeptoren exprimiert in Säugetierzellen, können Adenosin-Konzentrationen um 100 bis 300 nM die Subtypen A₁, A_{2A} und A₃ aktivieren (EC₅₀-Werte von Adenosin an A₁: 310 nM, A_{2A}: 730 nM und A₃: 290 nM).³⁰ Für eine Aktivierung des A_{2B}AR sind wesentlich höhere Adenosinkonzentrationen nötig (EC₅₀-Wert von Adenosin an humanen A_{2B}-Rezeptoren: 23.5 µM),³⁰ wie sie nur unter pathophysiologischen wie zum Beispiel unter hypoxischen Bedingungen auftreten können. Adenosinkonzentrationen steigen dann bis zum Hundertfachen des Basiswertes auf bis zu 10 bis 20 µM an.³¹

Die codierenden Gene für die Adenosinrezeptoren finden sich auf dem Chromosom 1 (1q31-32.1 für den A₁-Adenosinrezeptor³² und 1p13.1-21.1 für den A₃-Adenosinrezeptor³³), dem Chromosom 22 (22q12-13 für den A_{2A}-Adenosinrezeptor³⁴) sowie auf Chromosom 17 (17p11.2-12 für den A_{2B}-Adenosinrezeptor³⁵). Sie codieren Rezeptoren von 318 bis 412 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 32 bis 45 kDa.

1.2.2 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Adenosinrezeptoren gehören alle zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR, G-Protein steht für Guaninnukleotid-bindendes Protein) und weisen sieben helikale transmembranäre Regionen auf, die über drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen unterschiedlicher Länge miteinander verbunden sind und in einem extrazellulären Aminotermius bzw. einem intrazellulären Carboxyterminus enden.³⁶ Ihre Hauptfunktion besteht in der Signaltransduktion in das Zellinnere über eine Aktivierung von G-Proteinen. Im Jahr 2000 gelang erstmals mittels Röntgenstrukturanalyse die Strukturauflösung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, dem bovinen Rhodopsin-Rezeptor (siehe **Abb. 1-6**).³⁷

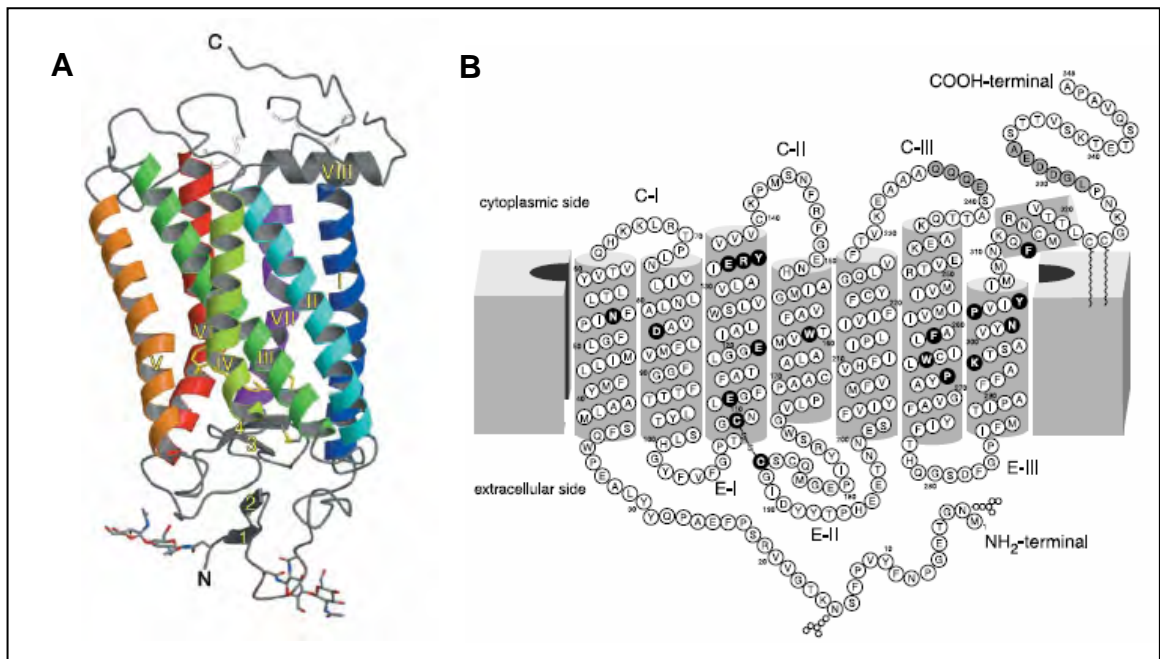


Abb. 1-6: A. Tertiärstruktur und B. Snake Plot des G-Protein-gekoppelten bovinen Rhodopsinrezeptors³⁷

Da die Kristallisation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften und der teilweise sehr geringen Expressionsdichten in der Membran sehr schwierig ist, konnte erst im Jahr 2007 eine weitere Kristallstruktur - die des ligandenaktivierten β_2 -adrenergen Rezeptors - aufgeklärt werden.³⁸ Allerneueste Forschungsergebnisse zeigen die Kristallstruktur des β_1 -adrenergen Rezeptors³⁹ sowie die des A_{2A} -Adenosinrezeptors gebunden mit dem selektiven A_{2A} -Antagonisten **ZM241385**, was die vierte Kristallstruktur eines GPCR überhaupt und die erste Kristallstruktur eines Adenosinrezeptors darstellt,⁴⁰ siehe **Abb. 1-7**.

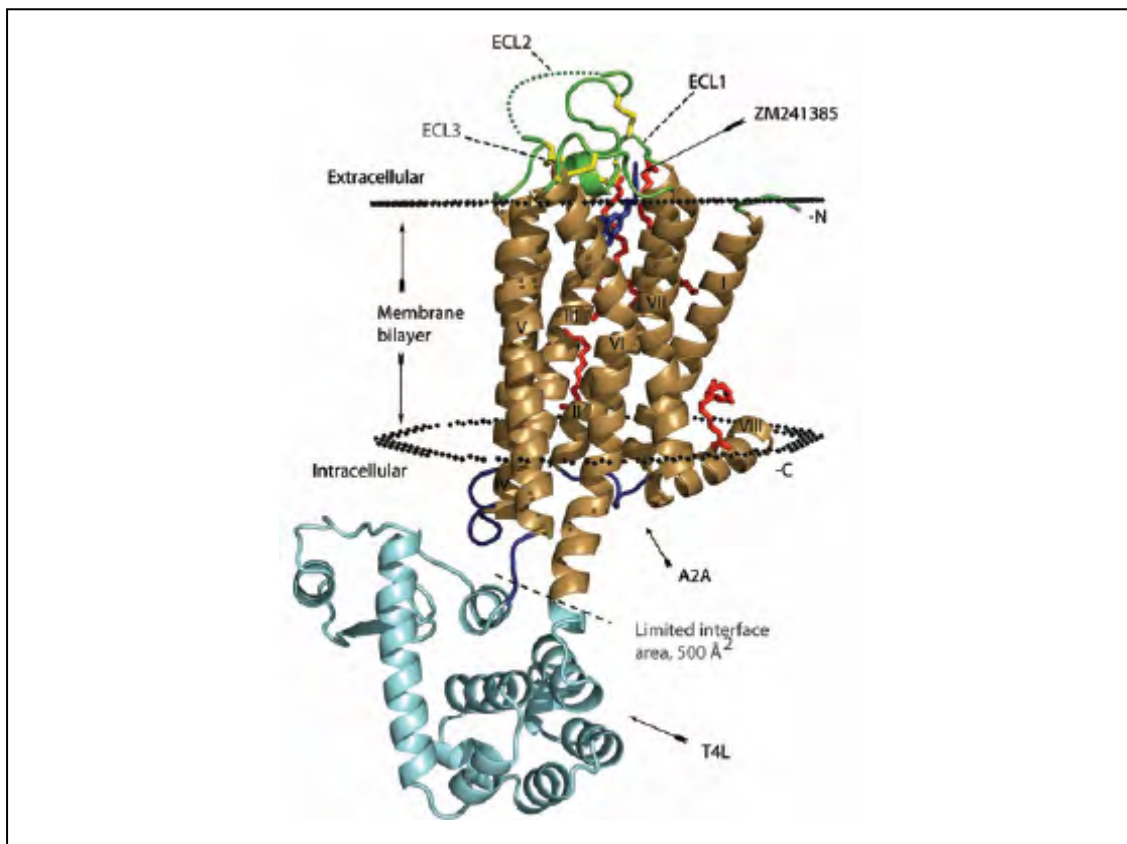


Abb. 1-7: Tertiärstruktur des A_{2A} -Adenosinrezeptors⁴⁰

Die Interaktion mit verschiedenen G-Proteinen findet an den zytoplasmatischen Schleifen statt, wobei hier vor allem die dritte Schleife zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne⁴¹ und Teile der zweiten Schleife zwischen dritter und vierter Transmembranregion⁴² eine wichtige Rolle für die G-Proteinbindung zu spielen scheinen. Die Bindung eines Agonisten erfolgt in den meisten Fällen in einer durch die ringförmige Anordnung der sieben transmembranären Helices gebildeten Bindungstasche, an denen hauptsächlich der N-Terminus, die transmembranären Domänen 5 bis 7 sowie

zwei konservierte Histidine (His250 bzw. His278 in A_{2A}AR) in Helix 6 und 7 beteiligt sind. Dies gilt für GPCR der Klasse A. Aber auch andere Bindungsstellen wurden für Agonisten beschrieben, zum Beispiel an den extrazellulären Schleifen für metabotrope Glutamatrezeptoren,⁴³ wichtigen Vertretern der GPCR-Klasse C. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Klasse A für endogene Agonisten – meist Neurotransmitter oder sogenannte „*small molecules*“ – wie z.B. biogene Amine, Adenosin u.a., besitzen in der zweiten extrazellulären Schleife und am Anfang der dritten transmembranären Domäne zwei konservierte Cysteinreste, die zur Disulfidbrückenbindung befähigt sind (siehe auch **Abb. 1-6 B**) und zusammen mit noch weiteren inter- und intrahelikalen Salzbrücken sowie hydrophoben Interaktionen die Struktur des Rezeptors im inaktiven Zustand stabilisieren.³⁶ Bindet ein Agonist an den Rezeptor und aktiviert ihn, so soll dies zu einer Sprengung der Salzbrücke führen, der Rezeptor erhält dadurch mehr Flexibilität und ändert seine dreidimensionale Struktur,³⁶ so eine Hypothese. Auf diesem Weg aktivierte Rezeptoren interagieren dann zur Signalweiterleitung mit heterotrimeren G-Proteinen (bestehend aus 3 Untereinheiten, genannt α , β und γ).⁴⁴

1.2.3 Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

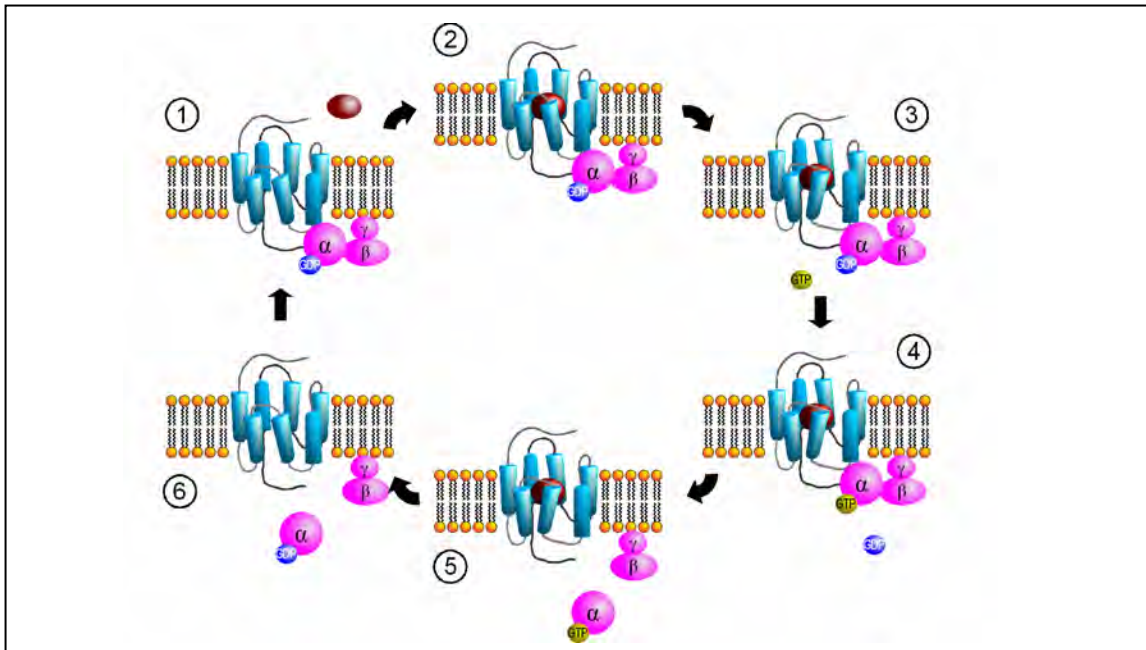


Abb. 1-8: Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

(Quelle: www.upload.wikimedia.org, Verfügbarkeitsdatum: 15.08.2008, Erläuterungen im Text)

Die Signalweiterleitung läuft im Detail dann wie folgt ab (siehe **Abb. 1-8**): Die α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine bindet im inaktiven Zustand des Rezeptors GDP (1). Die durch Bindung eines Agonisten (2) verursachte Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Austausch des GDP gegen GTP (3-4), wodurch sich das G-Protein in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit aufspaltet und diese vom Rezeptor wegdissoziieren können (5). Diese so aktivierten Untereinheiten des G-Proteins sind für die weitere Signaltransduktion verantwortlich und interagieren G-Protein-spezifisch mit weiteren Proteinen wie zum Beispiel der Adenylatcyclase oder Phospholipase C. Das GTP an der α -Untereinheit wird dann durch GTPase (unter Mithilfe von GTPase aktivierenden Proteinen, GAP) in GDP und Phosphat gespalten (6), die α -Untereinheit reasoziiert mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit und der Komplex kann nun wieder mit einem Rezeptor interagieren (1).

1.2.4 G-Protein-Kopplung der Adenosinrezeptoren

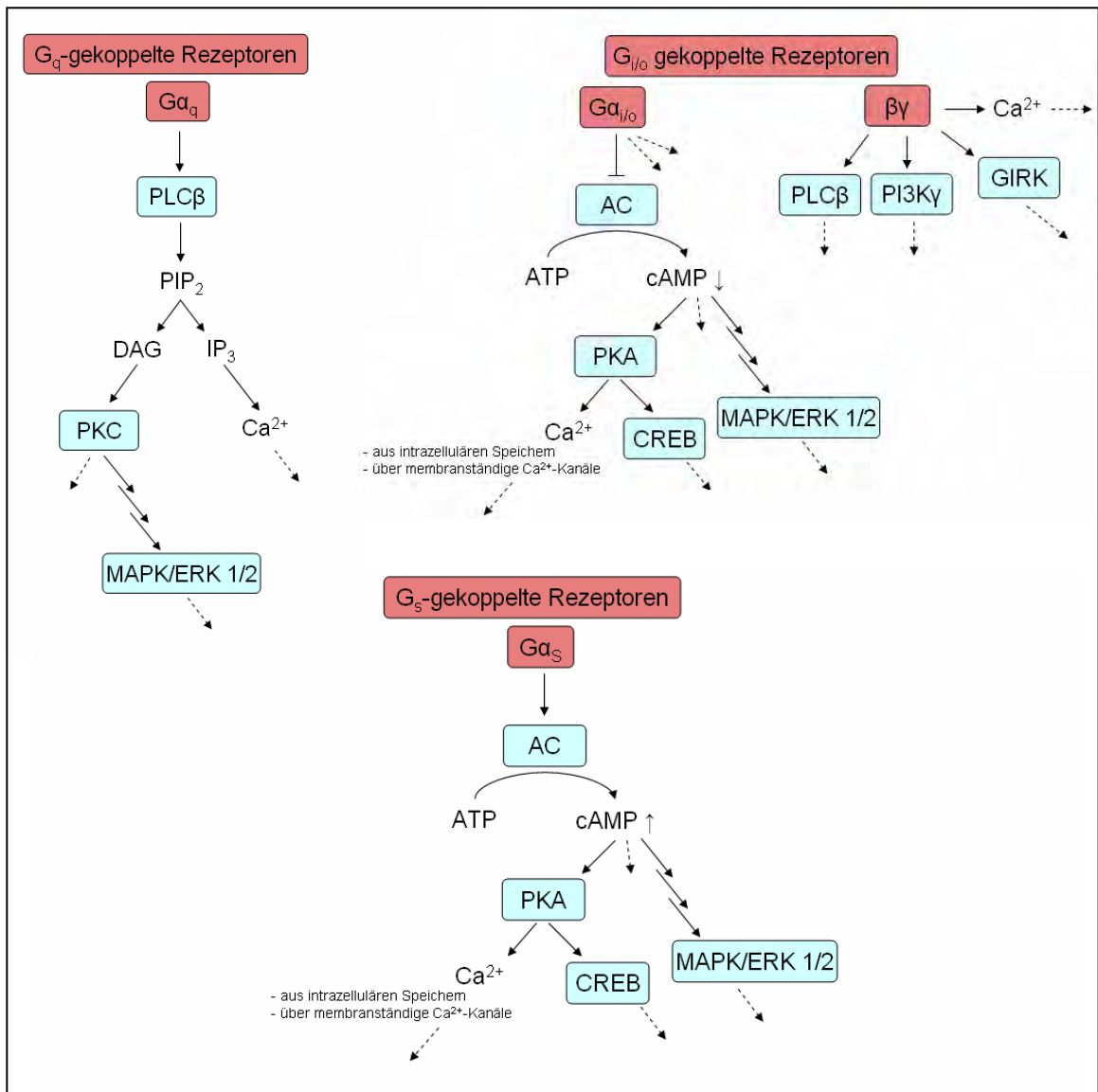


Abb. 1-9: G-Protein-Familien und ihre Effektorsysteme (Auswahl), modifiziert nach⁴⁵

AC: Adenylatcyclase, **ATP:** Adenosin-5'-triphosphat, **cAMP:** cyclisches Adenosin-3'5'-monophosphat, **CREB:** „cAMP response element-binding protein“, **DAG:** Diacylglycerol, **ERK:** „extracellular signal regulated protein kinase“, **GIRK:** „G Protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels“, **IP₃:** Inositol-1,4,5-trisphosphat, **MAPK:** Mitogen-aktivierte Proteinkinase, ERK 1 und 2 sind Vertreter davon, **PI3Kγ:** Phosphatidylinositol-3-Kinase γ, **PIP₂:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, **PKA:** Proteinkinase A, **PKC:** Proteinkinase C, **PLCβ:** Phospholipase Cβ.

Adenosinrezeptoren sind an verschiedene Kombinationen von G-Proteinen gekoppelt. So sind A₁-Adenosinrezeptoren G_i/G_o gekoppelt, was bei einer Rezeptoraktivierung die Hemmung der Adenylatcyclase (AC) zur Folge hat. Dies führt wiederum zu einer Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration.¹⁸ Außerdem kann über diesen Re-

zeptorsubtyp die Phospholipase C β aktiviert werden, welche einen Anstieg von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und nachfolgend der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt.⁴⁶ Des Weiteren sind A₁AR an Pertussistoxin- sowie ATP-sensitive Kaliumkanäle gekoppelt und können im Zusammenspiel mit A_{2A}AR die Aktivierung von ERK (*extracellular signal-regulated protein kinases*) steuern.⁴⁷

A_{2A}-Adenosinrezeptoren stimulieren die Adenylatcyclase durch eine Kopplung an G_s, welche die cAMP-abhängige Proteinkinase A aktiviert. Die dadurch erhöhten cAMP-Konzentrationen führen dann weiter zu Phosphorylierung und Aktivierung von verschiedenen Rezeptoren, Ionenkanälen, Phosphodiesterasen und Phosphoproteinen wie CREB und DARPP-32.⁴⁸⁻⁵⁰ Im Striatum stimuliert der A_{2A}AR auch G_{olf}, ein weiteres Mitglied der G_s-Subfamilie von G-Proteinen, welches die Adenylatcyclase des olfaktorischen Riechepithels stimuliert. Auch eine Interaktion mit verschiedenen Ca²⁺-Kanälen mit entweder einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegel oder erniedrigtem Ca²⁺-Influx wurde berichtet.^{51,52} Aufgrund eines sehr langen intrazellulären Carboxyterminus besitzt der A_{2A}AR ein höheres Molekulargewicht (45 kDa) im Vergleich zu den anderen Adenosinrezeptorsubtypen (36-37 kDa).⁵³ Dieser vergleichsweise lange C-Terminus scheint als Kontaktstelle für Interaktionen mit anderen Rezeptoren wie dem Dopamin-D₂-Rezeptor⁵⁴ und anderen Proteinen⁵⁵⁻⁵⁸ genutzt zu werden, das Fehlen oder Vorhandensein eines solchen Partners ermöglicht komplexere Signale und könnte widersprüchliche Ergebnisse wie eine beschriebene Neuroprotektion sowie Neurotoxizität durch Aktivierung von A_{2A}-Adenosinrezeptoren erklären.⁵⁹

A_{2B}-Adenosinrezeptoren koppeln analog zu den A_{2A}AR an G_s und stimulieren dadurch die Adenylatcyclase, was eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach sich zieht. Weiter wurde eine Kopplung über G_q an die Phospholipase C beschrieben, was einerseits einen Anstieg an Diacylglycerol (DAG) und damit eine Stimulierung der Proteinkinase C bewirkt, andererseits wird dadurch vermehrt IP₃ ausgeschüttet und damit verbunden Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern mobilisiert.⁶⁰ Dies wurde für mehrere Zelllinien nachgewiesen, Beispiele hierfür sind die humane Mastzelllinie HMC-1⁶¹ sowie HEK-293-Zellen.^{62,63} Eine Kopplung von A_{2B}-Adenosinrezeptoren an intrazelluläre Calciumkanäle wurde auch in der humanen Leukämiezelllinie Jurkat T gezeigt, allerdings resultiert dort die Aktivierung in einer Akkumulation von intrazellulärem Calcium über einen IP₃-unabhängigen Mechanismus.⁶⁴

Eine Aktivierung von A_3 -Adenosinrezeptoren inhibiert die Adenylatcyclase über eine Kopplung an G_i ,⁶⁵ des Weiteren wurde in der Ratten-Mastzelllinie RBL-2H3 und in Rattenhirngewebe eine Aktivierung der Phospholipase C durch eine G_q -Kopplung gefunden.^{66,67}

Für alle vier Adenosinrezeptoren wurde postuliert, dass sie zu einer Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) fähig sind,^{47,68} was vor allem eine Rolle bei der Proliferations-Regulation vieler Zelltypen durch Adenosin spielen dürfte.^{47,69}

Mit Ausnahme des A_{2A} -Adenosinrezeptors besitzen alle Subtypen eine Palmitylierungsstelle im C-Terminus,⁷⁰ mehrere N-Glykosylierungsstellen im N-Terminus wie auch im zweiten extrazellulären Loop konnten in den diversen Subtypen nachgewiesen werden.^{32,34,35,70}

Tab. 1-3: Pharmakologisches Profil der Adenosinrezeptoren

| Subtyp | A_1 | A_{2A} | A_{2B} | A_3 |
|---------------------------|--|---|---|---|
| G-Protein-Kopplung | $G_{i/O}$ | G_S / G_{olf} | G_S / G_q | G_i / G_q |
| Effektorsysteme | cAMP ↓ $K^+ \uparrow$ $Ca^{2+} \uparrow$ | cAMP ↑ $Ca^{2+} \uparrow \downarrow$ | cAMP ↑ $IP_3 \uparrow$ $Ca^{2+} \uparrow$ DAG ↑ | cAMP ↓ $IP_3 \uparrow$ $Ca^{2+} \uparrow$ DAG ↑ |

1.2.5 Allgemeine physiologische Funktionen von Adenosinrezeptoren

Das ubiquitär vorhandene Adenosin spielt unter anderem eine große Rolle im zentralen Nervensystem, wo es die Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter hemmt und dadurch sedierend wirkt, sowie in der Peripherie im kardiovaskulären System (negativ inotrope, chronotrope, dromotrope sowie antihypertensive Effekte), in Leber, Niere (antidiuretischer Effekt) und dem Immunsystem.¹⁶ Adenosinrezeptoren sind praktisch im gesamten Gewebe verteilt, wo sie speziesabhängig in unterschiedlicher Dichte exprimiert werden, die Expressionsprofile der humanen Adenosinrezeptor-Subtypen und potentielle Indikationen von Agonisten bzw. Antagonisten sind in **Tab. 1-4** dargestellt.

Tab. 1-4: Expressionsprofile und physiologische Effekte der humanen Adenosinrezeptor-Subtypen und mögliche Indikationen von Agonisten und Antagonisten (nach^{27,71-78})

| Humane Adenosinrezeptor-Subtypen | | | |
|--|--|---------------------------------------|--|
| A₁ | A_{2A} | A_{2B} | A₃ |
| <i>Expressionsprofile:</i> | | | |
| ZNS: ubiquitär, v.a. Cortex Cerebellum Hippocampus Rückenmark | ZNS: Caudate putamen Nucleus accumbens Tuberculum olfact. Thrombozyten | Dickdarm Blase | Leber Lunge Plazenta |
| Fett-Gewebe | Herz | ZNS: ubiquitär, v.a. Gliazellen | ZNS: ubiquitär |
| Herz | Lunge | Herz | Aorta |
| Niere | Leber | Lunge | Niere |
| Lunge | Niere | Mastzellen | Testes |
| Granulozyten (neutrophile) | Blutgefäße, Endothelzellen | Lymphozyten | Granulozyten (eosinophile und neutrophile) |
| | Lymphozyten | | Herz |
| <i>Physiologische Effekte der Agonisten:</i> | | | |
| sedierend antikonvulsiv bronchokonstriktorisches vasokonstriktiv antipolytisch | sedierend vasodilatierend antiinflammatorisch | vasodilatierend | sedierend |
| <i>Mögliche Indikationen für Agonisten:</i> | | | |
| Schlaganfall | Atemwegs- erkrankungen | | Schlaganfall |
| Epilepsie | Rheumatoide Arthritis | | Rheumatoide Arthritis |
| Migräne | Thrombose | | kardiale Ischämie |
| Schmerz | renale Ischämie | | Krebs |
| kardiale Ischämie | Bluthochdruck | | Lungenverletzung |
| Herzarrhythmie | Entzündungen, Sepsis | | |
| Schlafstörungen | | | |
| <i>Mögliche Indikationen für Antagonisten:</i> | | | |
| kognitive Störungen | Neurodegeneration | Asthma | Glaukom |
| Ödeme | M. Parkinson | Diabetes | Asthma |
| | M. Huntington | Diarrhoe | Nierenversagen |
| | Migräne | | |
| | Demenzen | | |
| | Depression | | |
| | Alkoholismus/Sucht | | |

An dieser Stelle soll auch auf die Möglichkeit von Adenosinrezeptoren hingewiesen werden, durch die Bildung von Homo- oder Heterooligomeren mit anderen Rezeptoren weitaus komplexere Signale zu vermitteln. So wurden zum Beispiel Homooligomere von A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren beschrieben, Heterooligomere wurden unter anderem zwischen A₁-Adenosinrezeptoren und D₁-Dopaminrezeptoren, A₁- und P2Y₁-, A₁- und P2Y₂- sowie A₁-Rezeptoren und dem metabotropen Glutamatrezeptor mGluR₁ gefunden. Der A_{2A}-Adenosinrezeptor scheint Heterooligomere mit dem D₂-Dopaminrezeptor, dem mGluR₅⁷⁹ sowie dem CB₁-Cannabinoidrezeptor⁸⁰ zu bilden. Dabei beeinflusst die Di- oder Oligomerisierung der Rezeptoren sowohl die Bindungspharmakologie der Liganden als auch die Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung genauso wie die Signalweiterleitung der Rezeptoren.⁷⁹ So scheint zum Beispiel die genannte Dimerisierung zwischen A_{2A}-Adenosinrezeptor und dem D₂-Dopaminrezeptor, die den Charakter einer antagonistischen Wechselwirkung besitzt, pathologisch bedeutsam bei der Parkinson'schen Krankheit zu sein.⁸¹

Obwohl oder vielleicht gerade weil Adenosin in viele physiologische und pathophysiologische Ereignisse involviert ist, sind bis heute nur Adenosin selbst und die unselektiven Adenosinrezeptorantagonisten Coffein und Theophyllin zur Therapie zugelassen⁷⁸ - aufgrund der weiten Verbreitung von Adenosinrezeptoren im Körper zieht eine direkte Einflussnahme in aller Regel auch ein breites Spektrum an Nebenwirkungen nach sich. Mitte 2008 wurde der selektive A_{2A}AR-Agonist **Regadenoson** (CVT3146, LexiscanTM) als Vasodilator von der FDA als Diagnostikum der Myokarddurchblutung zugelassen.^{82,83} Adenosin selbst ist als Diagnostikum im Entzündungsgeschehen der Atemwege sehr interessant, da seine Inhalation (bzw. die Inhalation der Vorstufe Adenosinmonophosphat) bei Asthmapatienten eine konzentrationsabhängige Bronchokonstriktion bewirkt, die bei gesunden Probanden nicht beobachtet werden kann. Da die Inhalation anderer Entzündungsmarker (wie z.B. Histamin oder Leukotriene) bei gesunden Probanden und Asthmapatienten dieselben Reaktionen hervorrufen, nimmt Adenosin eine interessante Sonderstellung als geeignetes Werkzeug zur Unterscheidung zwischen einer asthmatischen Erkrankung und anderen Atemwegserkrankungen (wie z.B. COPD) ein.^{31,84}

Ein weiterer Ansatzpunkt, um auf die Adenosin-vermittelten Effekte im Körper Einfluss zu nehmen, sind Adenosin-Wiederaufnahme- bzw. Adenosin-Metabolisierungs-

Mechanismen. So lässt sich die extrazelluläre Adenosinkonzentration erhöhen, indem man Enzyme wie die Adenosinkinase (EC 2.7.1.20, phosphoryliert Adenosin zu AMP) und die Adenosindesaminase **ADA** (EC 3.5.4.4, desaminiert Adenosin und 2'-Desoxyadenosin zu Inosin bzw. 2'-Desoxyinosin) hemmt – ein potenter Inhibitor der Adenosindesaminase ist z.B. **Coformycin** – oder die Adenosinwiederaufnahme durch spezifische Blockade von Adenosintransportern (zum Beispiel durch **Dipyridamol**) verhindert. Der Vorteil dieser indirekten Einflussnahme auf die extrazelluläre Adenosinkonzentration liegt in ihrer zielgerichteten Wirkung auf pathologische Prozesse, da sie nur dann relevant wird, wenn ohnehin (verstärkt) Adenosin freigesetzt wird.

1.3 Adenosinrezeptoren im Immunsystem

Extrazelluläres Adenosin akkumuliert in entzündeten oder beschädigten Geweben, wobei diese Akkumulation durch eine Unterbrechung der lokalen Mikrozirkulation und die dadurch bedingte Hypoxie ausgelöst wird. Es werden dabei Konzentrationen von bis zu 10 μM erreicht - dem Hundertfachen des Basalwertes.^{31,85} Diese erhöhten Adenosinkonzentrationen kommen einerseits durch eine Verringerung der intrazellulären ATP-Konzentration während einer Hypoxie und dadurch erhöhte AMP- und Adenosinkonzentrationen zustande,⁸⁶ andererseits wird unter hypoxischen Zuständen die Adenosinkinase gehemmt,⁸⁷ spezifische Transporter sorgen dann für einen Transport von Adenosin in den Extrazellulärraum.⁸⁸ Colgan *et al.* konnten zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen die membrangebundenen Enzyme Ecto-ATP-Apyrase (CD39) und Ecto-5'-Nukleotidase (CD73) verstärkt exprimiert werden⁸⁹ und so ihren Teil zu einer Erhöhung der extrazellulären Adenosinkonzentration beitragen.

Diese erhöhten Adenosinkonzentrationen zeigen in der Folge antiinflammatorische und Gewebe-protektive Effekte, welche einerseits über die Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (COX-2)^{90,91} zustande kommen, andererseits werden Adenosinrezeptoren aktiviert, wobei hier vor allem A_{2A} -Adenosinrezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen scheinen - ihre Expression wurde auf nahezu allen Zellen des Immunsystems wie zum Beispiel Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen nachgewiesen.^{78,92} Ohta und Sitkovsky sprachen ihnen dabei eine Rolle als Sensoren zu, deren Aufgabe es ist, eine Überreaktion der Immunantwort und damit eine Beschädigung von körpereigenem, gesundem Gewebe zu verhindern.⁹³ Sie beziehen sich dabei auf das von ihnen postulierte „2-Signal-Modell“ (siehe auch **Abb. 1-10**). Pathogene, Virus-infizierte, mutierte oder sonstwie beschädigte Zellen initiieren eine Immunantwort, indem sie Immunzellen aktivieren und diese daraufhin proinflammatorische Moleküle wie Zytokine sezernieren, dem ersten Gefahrensignal (a), was alles in allem zu einer Entzündung führt. Das Ausmaß dieser Immunantwort ist abhängig von der Art und Intensität des Gefahrensignals. Die aktivierten Immunzellen bekämpfen nun die Gefahrenquelle, können aber bei starker Aktivierung auch nicht-infizierte, gesunde Zellen angreifen (b). Werden dabei Zellen des Blutkreislaufes beschädigt, führt dies zu einer Verminderung oder gar Unterbrechung der Mikrozirkulation und damit zu einer Hypoxie (c, siehe

oben). Diese Hypoxie wiederum führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Adenosin (d, siehe oben), welches G_s-gekoppelte A₂-Adenosinrezeptoren vor allem vom A_{2A}-Subtyp auf den aktivierten Immunzellen stimuliert (e), dem zweiten Gefahrensignal. Dabei wird vermehrt intrazelluläres cAMP ausgeschüttet (f), was stark immunsuppressive Eigenschaften besitzt und im weiteren Verlauf weitere proinflammatorische Funktionen und Aktionen der Zelle inhibiert (g und h).^{93,94} In Analogie dazu wirkt die A₁- und A₃-Adenosinrezeptor-vermittelte Absenkung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen proinflammatorisch.⁹⁵

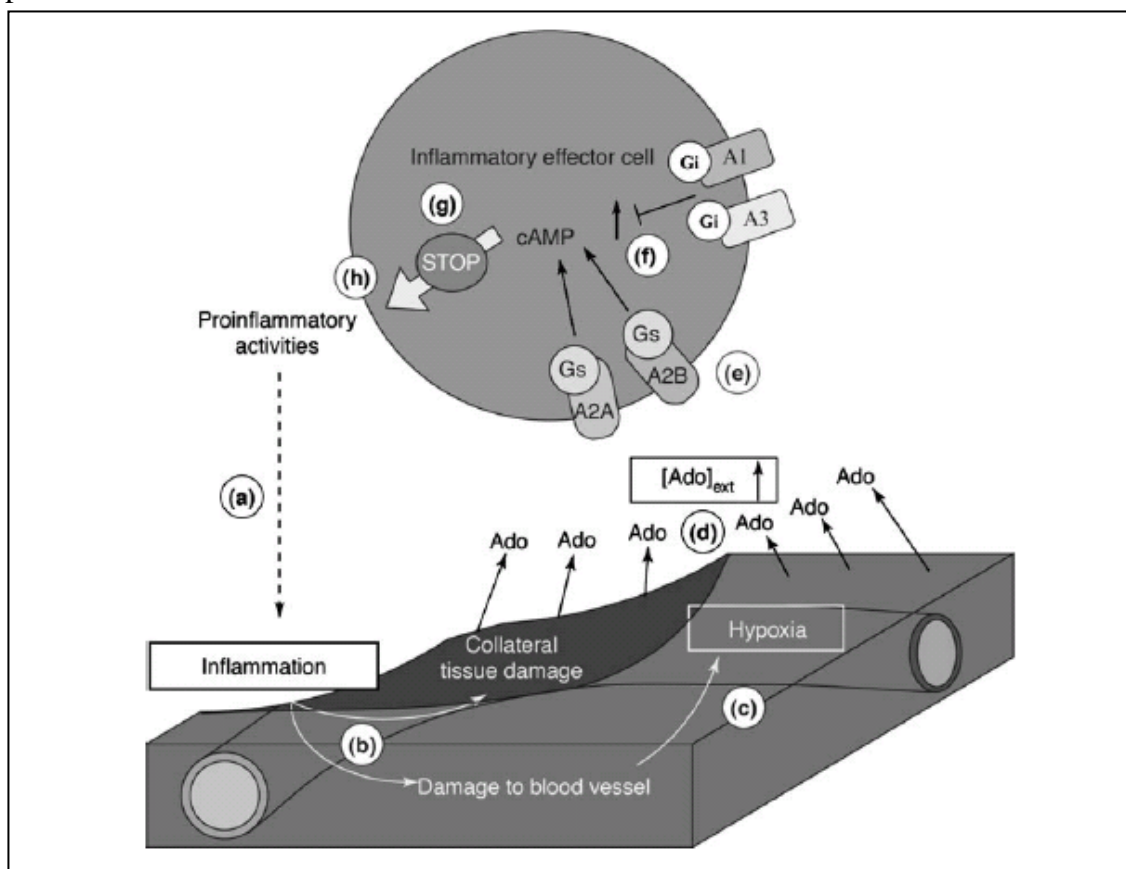


Abb. 1-10: Rolle der A₂-Adenosinrezeptoren im negativen Feedback-Mechanismus zur Herunterregulierung von aktivierten Immunzellen während einer Entzündung^{93,96}

Dieser negative Feedback-Mechanismus lässt Immunzellen genügend Zeit, Pathogene zu bekämpfen - schützt aber das gesunde Gewebe gleichzeitig vor einer überschießenden Immunreaktion, indem die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und zytotoxischer Moleküle effektiv gehemmt wird.⁹⁶

Diese These wird durch ein A_{2A}-Rezeptor-KO-Maus-Modell unterstützt, in dem gezeigt werden konnte, dass A_{2A}AR-KO-Mäuse schwere Gewebeschäden, höhere Konzentra-

tionen an proinflammatorischen Zytokinen und eine höhere Letalität nach Gabe von inflammatorischen Stimuli zeigten, welche wiederum in Wildtyp-Mäusen nur sehr geringe Schäden verursachten.⁹⁷ Obwohl A_{2A}-Adenosinrezeptoren primär für die antiinflammatorischen Effekte verantwortlich zu sein scheinen, gibt es auch Anhaltspunkte für eine Beteiligung der anderen Adenosinrezeptorsubtypen im Immunsystem – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. So wurde auch deren Expression auf mehreren Zellen des Immunsystems unterschiedlicher Spezies nachgewiesen, wie zum Beispiel auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen sowie B- und T-Lymphozyten.⁹⁵ Hierbei zeigt sich aber ein sehr viel komplexeres Bild. Adenosin kann sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte vermitteln, was von mehreren Faktoren wie dem involvierten Zelltyp, den äußeren Bedingungen und der Adenosinkonzentration abhängig zu sein scheint.^{31,98}

So hat eine Aktivierung des A₃AR auf humanen Monozyten eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α ,^{99,100} IL-6, IL-8 und IL-12^{100,101} zur Folge und es wird vermehrt das antiinflammatorisch wirksame IL-10¹⁰² gebildet.¹⁰³ Eine Aktivierung der Monozyten über proinflammatorische Zytokine zieht außerdem eine verstärkte Expression von A_{2A}-¹⁰⁴ und A_{2B}-Adenosinrezeptoren¹⁰⁵ nach sich. Auch in murinen und humanen Makrophagen wurde eine verstärkte Expression des A_{2A}-Adenosinrezeptors nach Stimulation des TLR-4 beschrieben,¹⁰⁶ genauso wie in humanen dendritischen Zellen nach TLR-Stimulation,¹⁰⁷ dort wird dabei außerdem gleichzeitig die Expressionen von A₁- und A₃-Adenosinrezeptoren heruntergefahren.¹⁰⁷ Adenosin stimuliert dabei unreife humane dendritische Zellen zu einer verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle wie MHC-I und -II. In reifen dendritischen Zellen verringert Adenosin die Ausschüttung von IL-12, TNF- α und des Chemokins CXCL-10 und stimuliert die Ausschüttung des antiinflammatorisch wirksamen IL-10.¹⁰⁸ Zusätzlich wird die Fähigkeit reifer humaner DC verhindert, eine Th₁-Differenzierung in CD4⁺ T-Zellen zu induzieren.¹⁰⁸ Humane Granulozyten exprimieren die Adenosinrezeptorsubtypen A₁, A_{2A} und A_{2B}¹⁰⁹ und können dabei über den A₁AR proinflammatorisch¹¹⁰ und über den A_{2A}AR antiinflammatorisch aktiviert werden, wobei die antiinflammatorischen Wirkungen überwiegen¹¹¹ und Adenosin zum Beispiel Granulozyten-vermittelte Endothelschädigungen vermindern kann,¹¹² indem es die Expression von β -Integrinen und damit die Adhäsion an das Endothel verringert^{110,113} sowie die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen^{114,115} und TNF- α ^{99,116} bzw. die Degranulierung von Granulozyten

inhibiert.¹¹⁷ Ein genau entgegengesetztes Bild zeigt sich in Mastzellen der Ratte: durch eine Aktivierung von A_{2A}- und A₃-Adenosinrezeptoren degranulieren Mastzellen und es werden vermehrt Histamin, Serotonin, Chemokine und Proteasen ausgeschüttet,^{118,119} die so vermittelte Entzündung scheint sich vor allem in den Atemwegen und der Lunge zu manifestieren.¹²⁰ Auch eine Beteiligung von humanen Mastzell-A_{2B}-Adenosinrezeptoren an entzündlichen Atemwegserkrankungen über die verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-6, IL-8 und IL-13 wurde postuliert.¹²¹ Mastzellen sind somit eine der wenigen Zelltypen des Immunsystems, die durch Adenosin nicht inhibiert sondern aktiviert werden.

Auch in den Zellen des adaptiven Immunsystems – den Lymphozyten – spielen Adenosinrezeptoren eine Rolle. Eine Stimulierung der Adenosinrezeptoren auf humanen B-Lymphozyten hat eine Erhöhung der cAMP-Konzentration zur Folge,¹²² welche wiederum verschiedene Effekte auf die B-Zellaktivierung hat, wie zum Beispiel den Eintritt in die G₁-Phase des Zellzyklus oder eine Regulierung des Ca²⁺-Einstromes.¹²³ Welche Rolle Adenosinrezeptoren allerdings auf die Regulation, Zellentwicklung, Antikörperproduktion und Zytokinausschüttung von B-Lymphozyten spielen, konnte bis dato noch nicht geklärt werden.¹²⁴

Auf T-Lymphozyten scheint Adenosin einen inhibitorischen Effekt auszuüben, sowohl auf CD4⁺- als auch auf CD8⁺-Subpopulationen. Es wird über eine Hemmung der Ausschüttung von IL-2¹²⁵ und IFN- γ ¹²⁶ in murinen Zellsystemen berichtet, genauso wie über eine Hemmung der Proliferation von Ratten-T-Zellen,¹²⁷ Zytotoxizität¹²⁸ und der Expression von Aktivierungsmarkern (murine Zellen).¹²⁶ Dabei scheint der A_{2A}-Adenosinrezeptor hauptverantwortlich für diese Effekte zu sein, er wird auf T-Lymphozyten am stärksten exprimiert^{125,127,129,130} und bei einer Aktivierung der T-Zellen noch weiter hochreguliert.^{126,131} Dementsprechend führt eine Aktivierung der Adenosinrezeptoren zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und der dadurch vermittelten T-Zell-inhibitorischen Effekte. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass eine mehrfache Aktivierung der Adenosinrezeptoren auf T-Zellen zu einem verminderten Signal führt, die Zellen sich sozusagen eine Rezeptoraktivierung merken können und das Ausmaß der Antwort bei jeder weiteren Aktivierung immer geringer wird.¹²⁵ Auf Grundlage dieses Mechanismus konnte eine Methode von Tumorzellen geklärt werden, sich vor Angriffen von zytotoxischen T-Zellen zu schützen: da in der Umgebung der

meisten Tumore eine lokale Hypoxie und somit erhöhte Adenosinkonzentrationen herrschen, führt dies immer wieder zur Stimulation der Adenosinrezeptoren auf den angreifenden T-Zellen, welche nach kurzer Zeit durch den „Dauerbeschuss“ mit Adenosin und der daraus resultierenden Toleranz unschädlich gemacht werden und so eine Koexistenz von Tumorzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten möglich wird, dem sogenannten Hellstrom-Paradoxon.¹³²

Auf Grundlage dieser Wirkungen von Adenosin auf die myeloiden und lymphoiden Zellen und der damit verbundenen Beteiligung an der Regulation des Immunsystems konnte gezeigt werden, dass Adenosin auch an der Pathophysiologie mehrerer entzündlicher Erkrankungen mitwirkt. So spielt Adenosin bei asthmatischen Erkrankungen und chronisch obstruktiver Bronchitis (COPD) eine wichtige Rolle^{31,78,84,95,133} und ist dabei mitverantwortlich für auftretende Bronchospasmen, vermittelt vor allem über A_{2B}-Adenosinrezeptoren auf Mastzellen. Im Widerspruch hierzu steht ein A_{2B}-Rezeptor-KO-Maus-Modell in dem gezeigt wurde, dass ein A_{2B}-Rezeptor-KO eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßendothelzellen zur Folge hat. Auf Grundlage dieses Maus-Modells wurde postuliert, dass der A_{2B}-Adenosinrezeptor antiinflammatorisches Potential besitzt.¹³⁴ Ansatzpunkte zur Erklärung dieser Datenlage lieferten Blackburn und Mohsenin mit ihrer These, dass A_{2B}-Adenosinrezeptoren nur durch pathologische Adenosinkonzentrationen aktiviert werden und damit mitverantwortlich für die Regulierung von schädlichen und schützenden Effekten von Adenosin auf das Gewebe sind – abhängig von der lokal herrschenden Adenosinkonzentration.¹³⁵ Ryzhov *et al.* konnten ebenfalls in einem A_{2B}-Rezeptor-KO-Mausmodell Daten reproduzieren die zeigen, dass diese Mäuse erhöhte TNF- α -Plasmaspiegel aufweisen.¹³⁶ Sie konnten jedoch die Interpretation von Yang *et al.*¹³⁴ nicht bestätigen, dass es sich dabei um eine Aktivierung von A_{2B}-Adenosinrezeptoren über endogenes Adenosin handelt, was wiederum für eine Inhibition der TNF- α -Ausschüttung in Wildtyp-Mäusen verantwortlich wäre. Sie beobachteten diese Effekte in Anwesenheit von ADA, was die Möglichkeit einer Rezeptoraktivierung über endogenes Adenosin praktisch ausschliesst, ausserdem konnte der A_{2B}AR-KO-Phänotyp durch selektive Blockade der Rezeptoren über Antagonisten wie **IPDX** oder **MRS-1754** in Wildtyp-Mäusen nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, durch Gabe der selektiven Antagonisten wurde die Adenosin-vermittelte Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 deutlich inhibiert.¹³⁶ Ein weiteres Argument, das gegen die

Interpretation von Yang *et al.* spricht, ist die Tatsache, dass A_{2A}AR-KO-Mäuse – einem im Immunsystem eindeutig als antiinflammatorisch wirksam identifizierten Rezeptor-subtyp – das Phänomen erhöhter TNF- α -Spiegel nicht zeigen, paradoxerweise werden bei diesen Mäusen sogar erniedrigte Spiegel beobachtet.^{137,138} In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass der neue, selektive A_{2B}AR-Antagonist **CVT-6883** entzündliche Erkrankungen der Lunge deutlich mildert,^{139,140} bzw. dass eine A_{2B}AR-Aktivierung bronchiale Entzündungen fördert.^{139,141} Weitere sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften wurden beschrieben,^{98,142-144} sodass die Rolle dieses Subtyps im Entzündungsgeschehen bis heute umstritten ist.

Endogenes Adenosin scheint auch eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu spielen und vermittelt hier im wesentlichen entzündungshemmende Effekte,^{145,146} vermittelt hauptsächlich über A_{2A}- und A₃-Adenosinrezeptoren.

Grob zusammengefasst kann man feststellen, dass Adenosin über den A₁-Adenosinrezeptor im Immunsystem auf vielerlei Weise hauptsächlich proinflammatorisch wirkt,¹⁴⁷ während der A_{2A}-Adenosinrezeptor in vielschichtiger Weise antiinflammatorische Effekte zeigt¹⁴⁸ und immunsuppressiv wirkt.¹⁴⁹ Für den A_{2B}-Adenosinrezeptor ist die Datenlage widersprüchlich, es lässt sich hier keine eindeutige Aussage treffen - der A₃-Adenosinrezeptor wiederum wird als hauptsächlich antiinflammatorisch beschrieben.¹⁴⁷ Diese Aussagen zeigen leider nur grobe Tendenzen auf und lassen sich in keinsten Weise verallgemeinern, eine differenzierte Betrachtung und weitere Untersuchungen scheinen unerlässlich zum besseren Verständnis der Rolle von Adenosinrezeptoren im Immunsystem, die bis heute immer noch nicht restlos geklärt werden konnte.

Ein weit verbreitetes Testsystem für T-Lymphozyten stellt die Zelllinie Jurkat T dar. Dabei handelt es sich um eine humane, akute lymphozytische Leukämie (ALL)-Zelllinie, die erstmals 1980 als eine Interleukin-2 produzierende Leukämie-T-Zelllinie beschrieben wurde.¹⁵⁰ Immunologisch charakterisiert sich diese Zelllinie in Übereinstimmung mit den allgemeinen Eigenschaften von T-Lymphozyten, sie ist CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD5⁺, CD6⁺, CD7⁺, CD8⁻, CD13⁻, CD19⁻, CD34⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁻.

1.4 Ziele der Arbeit

Wie eingangs dargelegt, spielen Adenosinrezeptoren – vor allem die beiden A_2 -Rezeptorsubtypen A_{2A} und A_{2B} – eine wichtige Rolle im Immunsystem und gelten aus diesem Grund als sehr interessante Zielstrukturen für die Neuentwicklung von Arzneistoffen zur Therapie entzündlicher Erkrankungen. Dabei sind die genaue Kenntnis und das Verständnis der physiologischen Funktionen und Zusammenhänge dieser Rezeptoren im Immunsystem, deren Expressionsdichten in den verschiedenen Zellen und Geweben sowie genaue Kenntnis und das Verständnis der nachgeschalteten intrazellulären Signaltransduktionswege von enormer Bedeutung. Zu erreichen sind diese Ziele nur über eine sehr eng verzahnte Zusammenarbeit von medizinisch-chemischer und pharmakologischer Forschung. Deren gemeinsames Ziel ist es, potente und selektive Rezeptorliganden zu identifizieren, die als pharmakologische Werkzeuge zur weiteren Charakterisierung der Rezeptoren, der Expressionsdichten und gekoppelten Signaltransduktionswege eingesetzt werden können. Darüber hinaus sollen neue Leitstrukturen zur Entwicklung potentieller neuartiger Wirkstoffe für den Einsatz in der Therapie gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Expressionsmuster von Adenosinrezeptoren auf humanen T-Lymphozyten aufgeklärt werden, dabei sollen alle vier bislang identifizierten Adenosinrezeptorsubtypen in die Untersuchungen einbezogen werden und auch ein Augenmerk auf die Veränderungen der Expressionsmuster infolge einer Stimulierung der Zellen gelegt werden. Die Versuche sollen sowohl auf mRNA-Ebene mittels Real-time-PCR-Experimenten als auch auf Proteinebene mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an primären humanen T-Lymphozyten und Zellen der humanen Leukämie-T-Zelllinie Jurkat T durchgeführt werden. Ausserdem sollen Versuche auf funktioneller Ebene zur Klärung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege vor allem von A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren in primären humanen T-Lymphozyten sowie Jurkat T-Zellen durchgeführt werden. Dazu kommen Messungen des intrazellulären Calciumspiegels $[Ca^{2+}]_i$ mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green® zum Einsatz.

Weitergehende Versuche sollen helfen, die physiologische Rolle der vier Adenosinrezeptorsubtypen im Immunsystem besser verstehen zu können. Dabei soll deren Einfluss auf die Proliferation von humanen T-Lymphozyten geklärt und damit die Rolle der einzelnen Adenosinrezeptorsubtypen herausgearbeitet werden.

Zur weiterführenden Charakterisierung der wichtigen physiologischen Rolle der Adenosinrezeptoren u.a. im Immunsystem ist es essentiell, auf eine breite Auswahl an Subtypselektiven Rezeptorliganden zurückgreifen zu können. Eine Möglichkeit zur Identifizierung neuer Leitstrukturen ist deren Isolierung aus Pflanzeninhaltsstoffen. Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich deshalb mit der Untersuchung der Interaktion verschiedener Baldrianextrakte unterschiedlicher Polarität mit A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren. Der Einfluss des Extraktionsverfahrens bzw. des Lösungsmittels und damit der Polarität auf das Bindungsverhalten sowie auf die intrinsische Aktivität sollen untersucht werden. Da in einer vorangehenden Studie ein Lignan-Glykosid als eine aktive Komponente hydrophiler Baldrianextrakte mit partial-agonistischer Aktivität am A₁-Adenosinrezeptor identifiziert werden konnte,¹⁵¹ sollen im Rahmen dieser Arbeit wenn möglich weitere Inhaltsstoffe mit Aktivität an einem der Adenosinrezeptoren isoliert und die Strukturen aufgeklärt werden, die dann als neue Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Adenosinrezeptorliganden dienen können. Dafür werden einerseits Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien zur Bestimmung der Affinitäten sowie andererseits [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien zur Aufklärung der funktionellen Eigenschaften der Extrakte bzw. der isolierten Inhaltsstoffe durchgeführt.

2 Bestimmung der Adenosinrezeptorexpression auf humanen T-Lymphozyten

2.1 Einleitung

Bereits in **Kapitel 1.3** wurden die vielfältigen Effekte beschrieben, mit denen Adenosin auf die Entwicklung und Funktion des Immunsystems Einfluss nimmt. Dabei hat Adenosin vielfältige Effekte, speziell auf die Funktionen der T-Lymphozyten, und wirkt hemmend auf die Lymphozytenproliferation. Es wurde gezeigt, dass Adenosin in T-Zellrezeptor-vermittelte Signalkaskaden eingreifen kann^{131,152} und damit T-Zell-vermittelte Wirkungen moduliert. Es inhibiert die T-Lymphozytenaktivierung und Effektorfunktionen wie T-Zelladhäsion an Tumorzellen und zytotoxische Aktivitäten.¹⁵³ Als hauptverantwortlich für diese Wirkungen konnte der A_{2A}-Adenosinrezeptorsubtyp identifiziert werden,¹⁵³ der auf humanen T-Lymphozyten auch dominant exprimiert ist.¹²⁷

Während der Suche nach dem Mechanismus, über den eine ADA-Insuffizienz einen schweren Immundefekt auslösen kann, vermuteten Wolberg *et al.* schon 1975 Adenosinrezeptoren auf humanen Lymphozyten, über die eine Immunantwort unterdrückt werden kann.¹⁵⁴ Marone *et al.* berichteten dann 1978 erstmals von einem spezifischen Adenosinrezeptor auf primären humanen Lymphozyten, über welchen Adenosin die Adenylatcyclase stimuliert und dadurch eine dosisabhängige Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt.¹⁵⁵ Er konnte als Adenosinrezeptor vom A₂-Typ charakterisiert werden.^{156,157} In mehreren darauf folgenden Studien konnte - über weitere funktionelle Versuche, Radioligand-Bindungsstudien und für den A_{2B}AR zusätzlich mittels monoklonaler Antikörper - die Expression von A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Adenosinrezeptoren auf primären humanen T-Lymphozyten nachgewiesen werden.^{92,157-162} Für alle drei gefundenen Adenosinrezeptoren wird eine Hochregulation der Expression nach der T-Zell-Stimulierung beschrieben.^{126,158,159}

Auch auf der humanen Leukämie-T-Zelllinie Jurkat T, einem gut charakterisierten Modellsystem für T-Lymphozyten, konnte die Expression von Adenosinrezeptorsubty-

pen nachgewiesen werden. So zeigten Van der Ploeg *et al.* über mRNA-Nachweise und funktionelle cAMP-Messungen die native Expression beider A₂-Adenosinrezeptorsubtypen, A_{2A} und A_{2B}.¹⁶³ Die Expression von A_{2B}-Adenosinrezeptoren konnte u.a. von Mirabet *et al.*, ebenfalls über funktionelle Untersuchungen und durch zusätzliche Studien mit einem monoklonalen Antikörper, bestätigt werden.^{64,158,162} Gessi *et al.* zeigten dann 2001 mit Hilfe von Radioligand-Bindungsstudien die Rezeptorproteinexpression für A₁-, A_{2A}- und A₃-Adenosinrezeptoren auf Jurkat T-Zellen,¹⁶⁴ der A_{2B}-Adenosinrezeptor konnte in dieser Studie nicht mit aufgenommen werden, da zu diesem Zeitpunkt kein geeigneter, selektiver und genügend affiner Radioligand für diesen Subtyp verfügbar war. Die fehlenden Versuche konnten mit Hilfe des neu entwickelten A_{2B}-Antagonist-Radioliganden [³H]PSB-298¹⁶⁵ nachgeholt werden. Im Rahmen ihrer Diplomarbeit konnte Daniela Bertarelli die Rezeptorexpression aller vier Adenosinrezeptorsubtypen auf Jurkat T-Zellen nachweisen.^{166,167} Dabei zeigten sich jedoch signifikante Abweichungen der bestimmten Rezeptordichten zu den von Gessi *et al.* gefundenen B_{max}-Werten.^{164,166} Diese Abweichungen lassen sich nur zu einem Teil durch die Verwendung unterschiedlicher Radioliganden erklären. Eine weitaus größere Rolle dürfte die Tatsache spielen, dass unterschiedliche Zellklone existieren, denn Daniela Bertarelli konnte im Rahmen ihrer Untersuchungen an mehreren Klonen der Jurkat T-Zelllinie auch mehrere, unterschiedliche Expressionsmuster für Adenosinrezeptoren beobachten. Es deutet also vieles darauf hin, dass verschiedene Klone von Jurkat T-Zellen existieren, die sich in ihrer Adenosinrezeptorexpression deutlich unterscheiden.¹⁶⁷

Bis dato konnte die genaue Rolle der Adenosinrezeptoren im Immunsystem noch nicht vollständig geklärt werden. Eine wichtige Frage, die es zu klären gilt, sind dabei die genauen Aufgaben und Wirkungen der einzelnen Adenosinrezeptorsubtypen auf die Zellen des Immunsystems. Dies ist auch im Hinblick auf den Einsatz verschiedener selektiver Adenosinrezeptorliganden als potentielle antiinflammatorische und immunmodulierende Arzneistoffe von großer Bedeutung. Die Kenntnis darüber, in welchem Maße die einzelnen Adenosinrezeptorsubtypen auf den Zellen exprimiert werden, gibt erste wichtige Anhaltspunkte zur Klärung dieser Frage, da ein hoher Expressionslevel eines bestimmten Adenosinrezeptorsubtyps auf eine wichtige Rolle dieses Subtyps im Immunsystem hinweisen würde. Das Ziel des vorliegenden Projektes war es deshalb, die Expression aller vier bisher bekannten Adenosinrezeptorsubtypen auf humanen T-Lymphozyten zu untersuchen bzw. zu überprüfen, sowohl auf Transkriptionsebene

durch Messung der mRNA mittels Real-time-PCR, als auch auf Proteinebene mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. Dafür wurden unstimulierte und PHA-stimulierte primäre humane T-Lymphozyten eingesetzt, um die Expression der Adenosinrezeptoren in ruhenden Zellen und auch die Veränderungen der Rezeptorexpressionen nach Stimulation der Zellen zu messen. Auch die Adenosinrezeptorexpression auf zwei Jurkat T-Zelllinien, mit denen im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde, sollte untersucht werden. Für die Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien wurden sowohl ganze, intakte Zellen als auch Membranpräparationen eingesetzt.

2.2 Bestimmung der Adenosinrezeptor-Transkripte durch Messung der mRNA mittels Real-time-PCR

Im Rahmen des humanen Genomprojektes, das im Jahre 1990 begonnen wurde und dessen Aufgabe es war, die komplette Genomsequenz des menschlichen Erbgutes zu entschlüsseln, konnten bis im Jahre 2003 – dem Jahr des offiziellen, erfolgreichen Abschlusses des Projektes – 2.85 Milliarden Basen identifiziert werden.^{168,169} Diese Basen sind auf 46 Chromosomen à 48 bis 240 Millionen Basen verteilt und es ergeben sich daraus ca. 26000 Gene.¹⁶⁹ Während des Vorgangs der Transkription wird von bestimmten Genen im Zellkern die DNA abgelesen und in komplementäre mRNA-Moleküle „überschrieben“. Dies ist der erste, initiale Schritt der Proteinbiosynthese. Die Gesamtheit der mRNA einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt wird als Transkriptom bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit sollte die mRNA für die vier Adenosinrezeptorsubtypen A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ sowie für das sogenannte Housekeeping-Gen β -Aktin als Kontrolle in primären humanen T-Lymphozyten (unstimuliert und Phytohaemagglutinin (PHA)-stimuliert) sowie in zwei unterschiedlichen Jurkat T-Zelllinien bestimmt werden. Dafür wurden Real-time-PCR-Experimente durchgeführt. Die Real-time-Polymerase-Kettenreaktion ist eine zu Beginn der 1990er-Jahre entwickelte Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei wird durch das Real-time-Verfahren mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen DNA-interkalierender Farbstoffe während jedem PCR-Zyklus zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht.^{170,171} Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die Isolierung der mRNA, deren Umschreiben in cDNA und die Durchführung bzw. Auswertung der Real-time-PCR sind in **Kapitel 7.7**, Material und Methoden, genauer beschrieben. Als Referenzgen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit β -Aktin gearbeitet. Aktine sind Strukturproteine, die in allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden und dabei einen wichtigen Bestandteil des Zytoskelettes darstellen, sie sind also für den Erhalt der Struktur und der Grundfunktion der Zellen essentiell. Die ermittelten C_T-Werte für β -Aktin waren für die untersuchten cDNA-Proben nicht signifikant unterschiedlich, weshalb die Real-time-PCR direkt auswertbar ist und die Ergebnisse für die Adenosinrezeptor-Transkripte in Bezug zueinander gesetzt werden können.

Die statistische Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe eines Student's t-Test, wobei ns = nicht signifikant ($P > 0.05$); * = signifikant ($P < 0.05$); ** = sehr signifikant ($P < 0.01$) und *** = äußerst signifikant ($P < 0.001$) bedeutet.

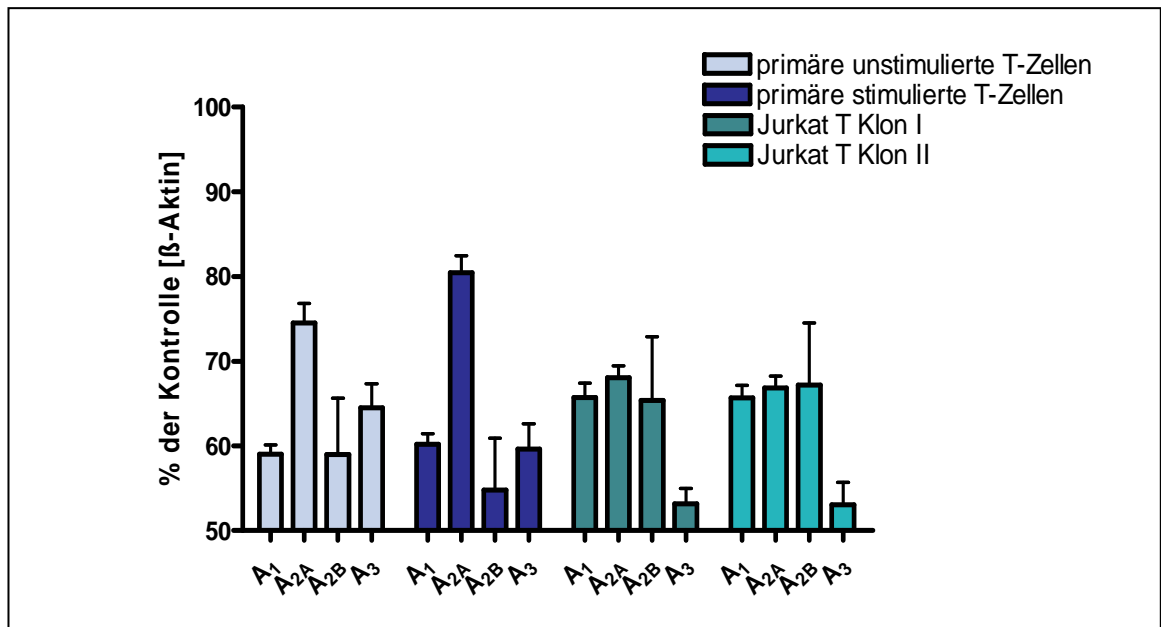


Abb. 2-11: Real-time-PCR. Adenosinrezeptor-Transkripte in verschiedenen humanen T-Lymphozyten berechnet nach der Standardkurvenmethode. Dargestellt ist die mRNA-Expression der vier Adenosinrezeptorsubtypen in Bezug auf β -Aktin, sortiert nach primären unstimulierten und PHA-stimulierten T-Lymphozyten sowie den zwei Jurkat T-Zelllinien, $n=3 \pm \text{SEM}$.

In **Abb. 2-11** sind die mittels Real-time-PCR ermittelten mRNA-Expressionen der vier Adenosinrezeptorsubtypen in humanen T-Lymphozyten dargestellt. Dabei kann festgehalten werden, dass in der cDNA von allen vier untersuchten Zelltypen/Zelllinien jeweils die mRNA für alle Adenosinrezeptorsubtypen nachgewiesen werden konnte – allerdings in unterschiedlichen Expressionsniveaus. In unstimulierten primären humanen T-Lymphozyten ist der A_{2A}AR der am stärksten exprimierte Subtyp, gefolgt von der Expression des A₃AR. A₁AR und A_{2B}AR sind in etwa gleich stark exprimiert und stellen die am schwächsten exprimierten Adenosinrezeptorsubtypen auf primären unstimulierten T-Lymphozyten dar ($A_{2A} \gg A_3 > A_1 = A_{2B}$). Ein ähnliches Bild zeigt sich für stimulierte primäre humane T-Lymphozyten. Die Zellen wurden dabei vor der Isolierung der mRNA für 24 – 48 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ PHA stimuliert. Dabei ist auch hier der A_{2A}AR der am stärksten exprimierte Subtyp, allerdings gefolgt von der in etwa gleich starken Expression der A₁- und A₃-Adenosinrezeptoren, der A_{2B}AR ist der am schwächsten exprimierte Adenosinrezeptorsubtyp auf primären PHA-stimulierten

T-Lymphozyten ($A_{2A} \gg A_1 = A_3 > A_{2B}$). Dabei werden durch die PHA-Stimulierung der primären humanen T-Lymphozyten die A_{2A} AR tendenziell hochreguliert (**Abb. 2-12**), was in sehr guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Befunden für die Stimulierung primärer humaner T-Lymphozyten steht.^{126,131,172} Im Gegensatz dazu scheint die Rezeptorexpression der A_{2B} AR und A_3 AR eher herunterreguliert zu werden. In der Literatur wird im Gegensatz dazu für diese Rezeptorsubtypen ebenfalls eine Verstärkung der Expression infolge einer Stimulierung der Zellen beschrieben.^{158,159} Die Expression der A_1 -Adenosinrezeptoren scheint durch die Stimulierung der Zellen nicht beeinflusst zu werden.

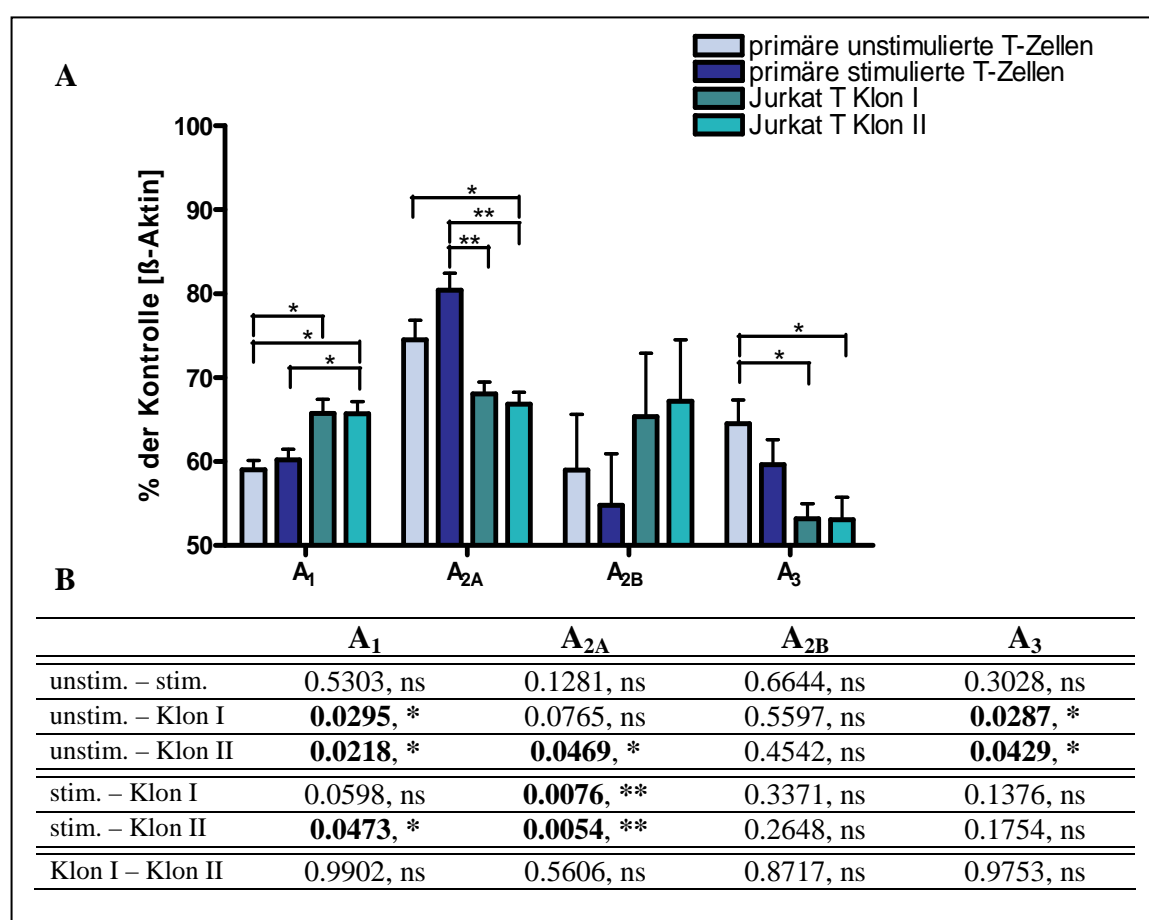


Abb. 2-12: Real-time-PCR. **A.** Adenosinrezeptor-Transkripte in verschiedenen humanen T-Lymphozyten berechnet nach der Standardkurvenmethode. Dargestellt ist die mRNA-Expression der vier Adenosinrezeptorsubtypen in verschiedenen humanen T-Lymphozyten in Bezug auf β -Aktin, sortiert nach der Expression von A_1 -, A_{2A} -, A_{2B} - und A_3 -Adenosinrezeptoren, $n=3 \pm$ SEM. **B.** Zugehörige Signifikanzen (P-Werte) berechnet mit Hilfe eines Student's t-Test.

Für die beiden untersuchten Jurkat T-Zelllinien lässt sich feststellen, dass sie in ihrem Adenosinrezeptor-Expressionsprofil nahezu identisch sind, es scheint sich hier also um denselben Zellklon zu handeln. Für weitere Untersuchungen wurden deshalb auch keine

Unterscheidungen zwischen den beiden Zelllinien mehr vorgenommen und immer nur noch jeweils eine Zelllinie (Klon I) eingesetzt. Die untersuchten Jurkat T-Zellen zeigen dabei in etwa gleich starke Expressionsraten für A_1 -, A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren. Nur der A_3 -Adenosinrezeptor scheint in Jurkat T-Zellen signifikant schwächer exprimiert zu werden ($A_1 = A_{2A} = A_{2B} \gg A_3$), siehe **Abb. 2-11**. Im Vergleich zu primären unstimulierten T-Lymphozyten zeigen dabei Jurkat T-Zellen signifikant höhere Expressionsraten für A_1 -Adenosinrezeptoren (siehe **Abb. 2-12**). Auch A_{2B} -Adenosinrezeptoren werden in Jurkat T-Zellen in wesentlich höherem Maße exprimiert als in unstimulierten primären T-Lymphozyten, dies konnten Mirabet *et al.* bereits 1999 in Studien mit einem monoklonalen Antikörper zeigen.¹⁵⁸ Die Unterschiede sind aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen nicht signifikant.

Sowohl A_{2A} - als auch A_3 -Adenosinrezeptoren werden in primären humanen T-Lymphozyten signifikant stärker exprimiert als in der humanen Leukämie-T-Zelllinie Jurkat T. In **Tab. 2-5** sind die Ergebnisse der Real-time-PCR zusammenfassend dargestellt.

Tab. 2-5: Zusammenfassung der Expressionsprofile der Adenosinrezeptor-Transkripte in verschiedenen humanen T-Lymphozyten (in rot dargestellt sind die insgesamt höchsten Expressionsraten für die vier Adenosinrezeptorsubtypen).

| Zelltyp/Zelllinie | Expressionsprofil des Adenosinrezeptor-Transkripts |
|---------------------------------------|--|
| primäre unstimulierte T-Lymphozyten | $A_{2A} \gg A_3 > A_1 = A_{2B}$ |
| primäre PHA-stimulierte T-Lymphozyten | $A_{2A} \gg A_1 = A_3 > A_{2B}$ |
| Jurkat T (Klon I und II) | $A_1 = A_{2A} = A_{2B} \gg A_3$ |

2.3 Bestimmung der Adenosinrezeptorexpressionsmuster mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Um die mittels Real-time-PCR erhaltenen Expressionsraten der Adenosinrezeptor-mRNA zu verifizieren, wurden Studien zu Rezeptorexpressionsraten auf Proteinebene durchgeführt. In der nach der Transkription folgenden Translation wird der Code der Nukleinsäuren, verschlüsselt in der mRNA, in Aminosäuren übersetzt und daraus werden Proteine aufgebaut – die eigentlichen Träger der Funktionen der Gene. Die quantitative Darstellung der exprimierten Proteine einer Zelle, eines Organs oder Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt unter genau definierten Bedingungen bezeichnet man als Proteom.^{173,174} In Anbetracht der gering erscheinenden Zahl an Genen (ca. 26 000), die das menschliche Genom bilden – man hatte wesentlich mehr erwartet¹⁶⁹ – erscheint es umso erstaunlicher, dass die Anzahl der daraus resultierenden Proteine sehr viel höher ist. Die meisten Funktionen unseres Körpers werden von Proteinen ausgeführt und das menschliche Proteom wird auf über 100 000 Proteine geschätzt, die genaue Zahl konnte bis heute noch nicht geklärt werden. Diese Diversität ergibt sich aus Modifikationen und konstitutivem bzw. differentiellem Spleißen auf transkriptioneller, post-transkriptioneller und post-translationaler Ebene, wodurch sich aus einer einzigen DNA-Sequenz mehrere mRNA-Moleküle und durch Translation daraus wiederum mehrere Proteine ergeben können.¹⁷⁵

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Adenosinrezeptorprotein-Expressionsmuster auf humanen T-Lymphozyten charakterisiert werden. Dafür wurden Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranpräparationen sowie an intakten, ganzen primären T-Lymphozyten und Jurkat T-Zellen durchgeführt.

2.3.1 Adenosinrezeptorexpression auf primären humanen T-Lymphozyten

Um die Adenosinrezeptorexpression auf primären humanen T-Lymphozyten bestimmen zu können, wurden erste Vorversuche an Membranpräparationen der Zellen durchgeführt. Dafür wurden für die vier Adenosinrezeptorsubtypen jeweils die unspezifische Bindung und die Gesamtbindung experimentell bestimmt und daraus die resultierende spezifische Bindung berechnet.

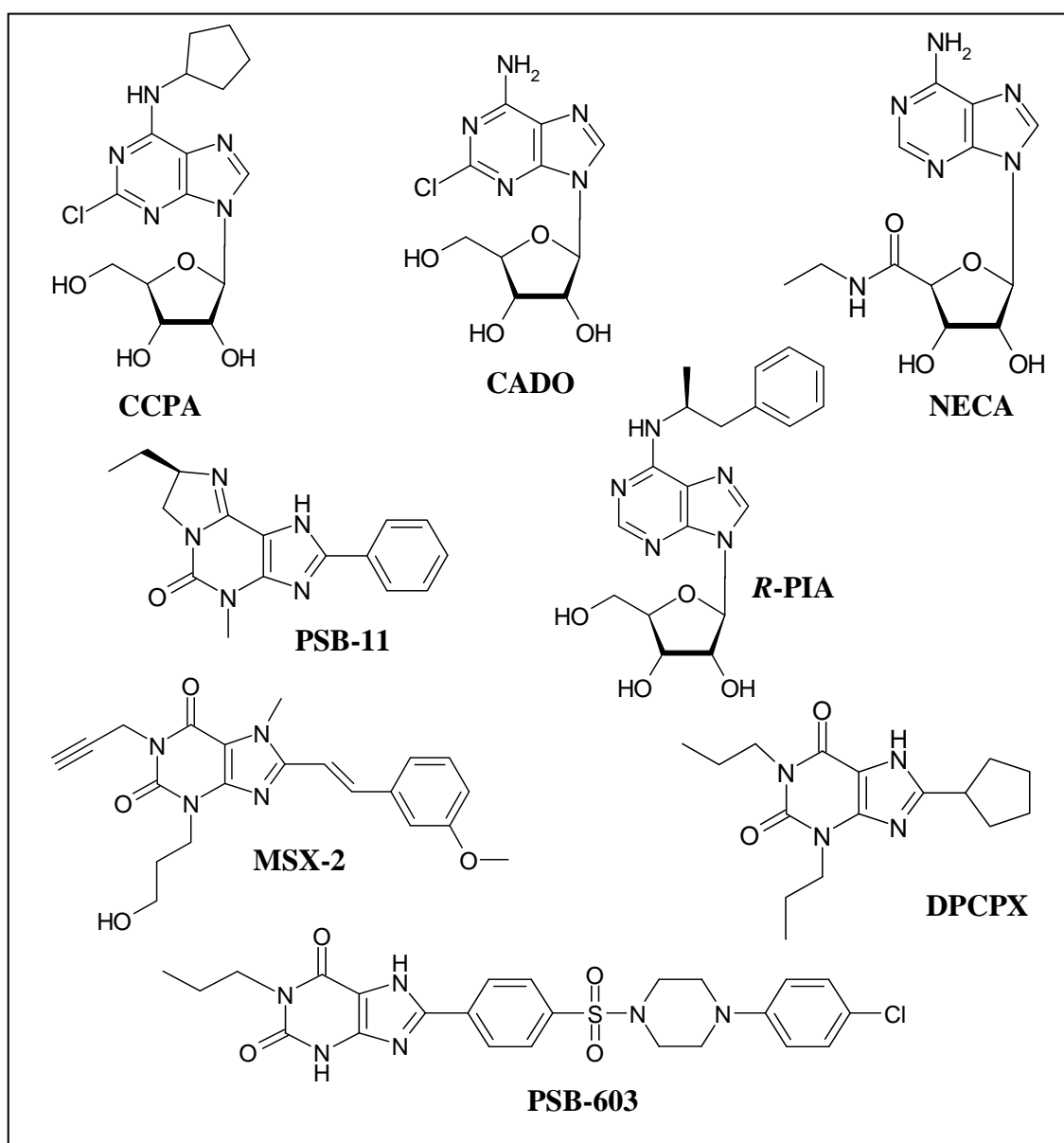


Abb. 2-13: Strukturformeln der in den Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranpräparationen primärer humaner T-Lymphozyten verwendeten Adenosinrezeptor-Radioliganden bzw. Kaltliganden.

Gearbeitet wurde dabei mit den Radioliganden [^3H]CCPA (A_1 -selektiv), [^3H]MSX-2 (A_{2A}), [^3H]PSB-603 (A_{2B}) und [^3H]PSB-11 (A_3). Die unspezifische Bindung wurde jeweils mittels hoher Konzentrationen der affinen Adenosinrezeptor-Liganden **CADO** (A_1), **NECA** (unselektiv, hier zur Bestimmung der Bindung an $A_{2A}\text{AR}$ eingesetzt), **DPCPX** (A_1 , aber auch gute Affinität am $A_{2B}\text{AR}$, zu dessen Bestimmung hier eingesetzt) und **R-PIA** (A_1 , aber auch gute Affinität am $A_3\text{AR}$, zu dessen Bestimmung hier eingesetzt) bestimmt. Die Strukturformeln sind in **Abb. 2-13** dargestellt. Es wurden Membranpräparationen sowohl von unstimulierten primären humanen T-Lymphozyten als auch von PHA-stimulierten Zellen eingesetzt.

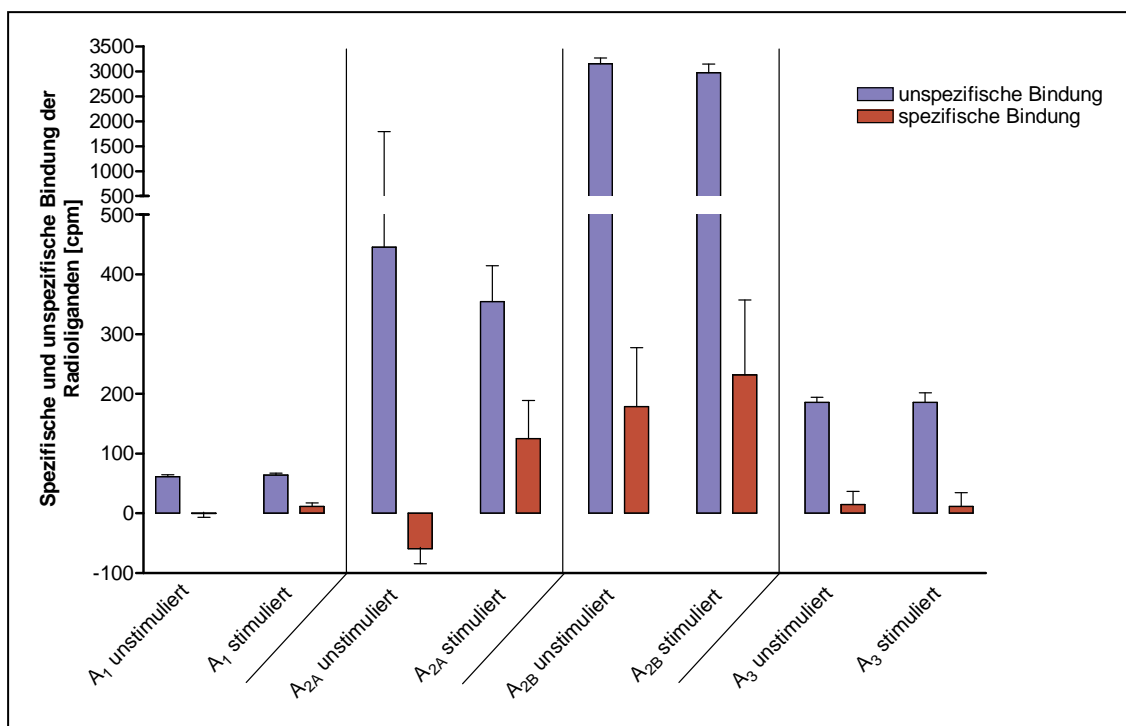


Abb. 2-14: Spezifische und unspezifische Bindung der Radioliganden ($A_1\text{AR}$: [^3H]CCPA, $A_{2A}\text{AR}$: [^3H]MSX-2, $A_{2B}\text{AR}$: [^3H]PSB-603, $A_3\text{AR}$: [^3H]PSB-11) an Membranpräparationen unstimulierter und PHA-stimulierter primärer humaner T-Lymphozyten, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Bei diesem ersten Experiment konnte eine, wenn auch geringe, spezifische Bindung für [^3H]MSX-2 an Membranen stimulierter primärer T-Lymphozyten und für [^3H]PSB-603 an Membranen sowohl unstimulierter als auch stimulierter T-Lymphozyten nachgewiesen werden (**Abb. 2-14**). Sowohl an A_1 - als auch an A_3 -Adenosinrezeptoren konnte keinerlei spezifische Bindung gemessen werden. Als problematisch erwies sich bei diesen Versuchen die relativ hohe unspezifische Bindung. Dadurch war es leider nicht möglich, Sättigungsexperimente an den Membranen zur Bestimmung der B_{max} - und K_D -Werte durchzuführen. Des Weiteren erwies sich die Arbeit mit Membranpräparationen

primärer humaner T-Lymphozyten insgesamt als schwierig und sehr Zeit- und Materialaufwändig, da die Zellen – anders als Zellen einer permanenten Zelllinie – alle aus „buffy coats“, die aus dem Blut freiwilliger Spender (bezogen über den Blutspendedienst des Universitätsklinikums Bonn) gewonnen werden, isoliert werden müssen. Somit waren die Proteinausbeuten der Membranpräparationen sehr gering und es war auch nicht möglich, die Zellen bis zu einer gewünschten Dichte zu kultivieren, da sich die frisch isolierten primären T-Zellen per se in einem Grundzustand (G₀-Phase des Zellzyklus) befinden und keine Zellteilungsaktivitäten zeigen (siehe **Kapitel 4**).

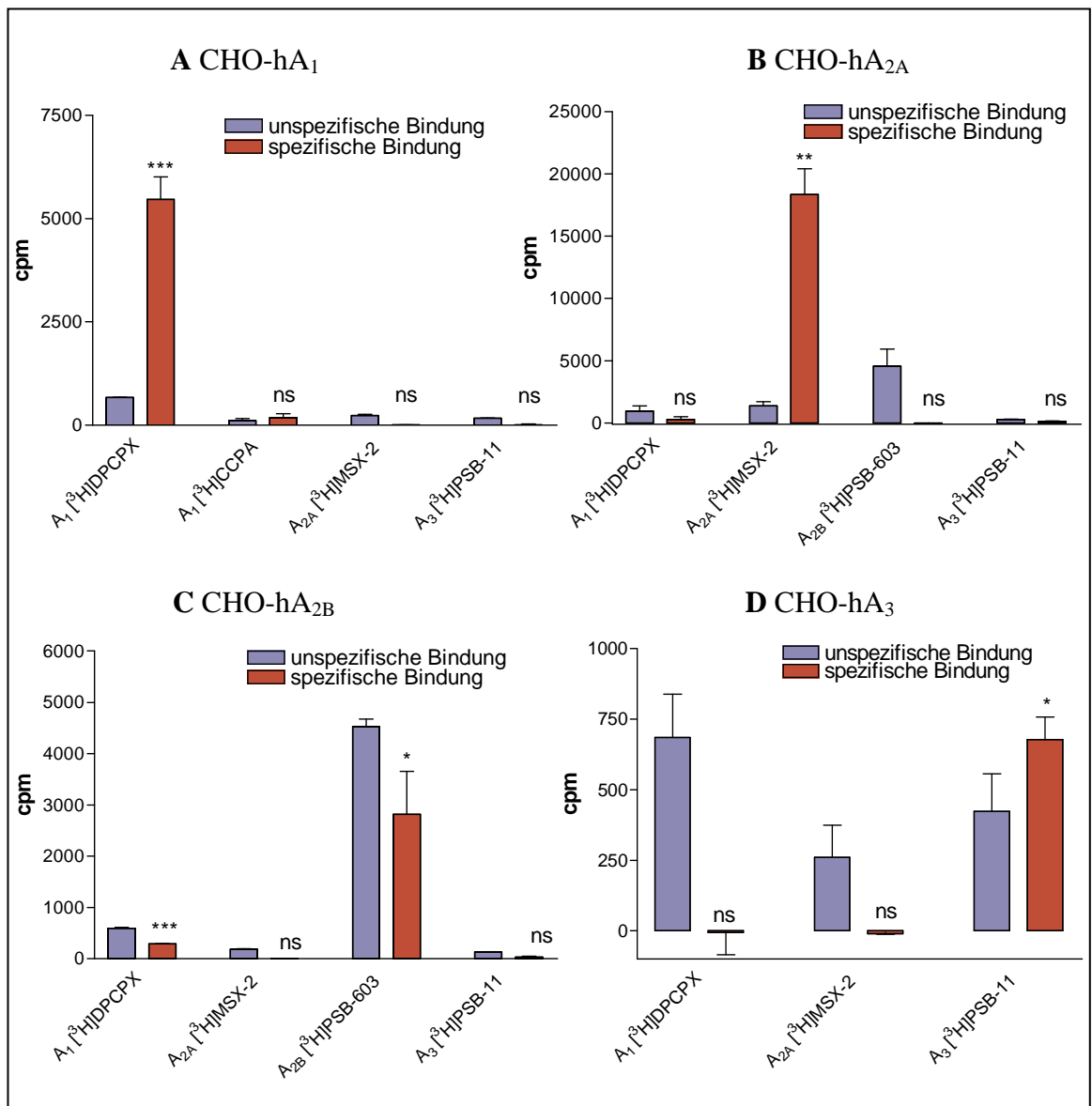


Abb. 2-15: Spezifische und unspezifische Bindung der Radioliganden (A₁AR: [³H]DPCPX bzw. [³H]CCPA, A_{2A}AR: [³H]MSX-2, A_{2B}AR: [³H]PSB-603, A₃AR: [³H]PSB-11) an intakten CHO-Zellen transfiziert mit jeweils einem Adenosinrezeptorsubtyp: **A.** CHO-hA₁ **B.** CHO-hA_{2A} **C.** CHO-hA_{2B} **D.** CHO-hA₃, n=3 ± SEM.

Aus diesen Gründen wurde versucht, die Experimente an intakten, ganzen Zellen durchzuführen. Erste Vorversuche zur Etablierung der Versuche wurden an intakten CHO-Zellen, die jeweils mit einem der vier humanen Adenosinrezeptorsubtypen transfiziert wurden, durchgeführt. Die Versuche wurden in KRH-Puffer bei 37°C ausgeführt, das genaue Vorgehen ist in **Kapitel 7**, Material und Methoden, beschrieben. Wie in **Abb. 2-15** veranschaulicht, konnte an intakten CHO-Zellen jeweils eine signifikante spezifische Bindung für den Adenosinrezeptorsubtyp gemessen werden, mit dem die CHO-Zellen transfiziert wurden. So konnte an CHO-hA₁-Zellen spezifische Bindung für [³H]DPCPX, an CHO-hA_{2A}-Zellen spezifische Bindung für [³H]MSX-2, an CHO-hA_{2B}-Zellen spezifische Bindung für [³H]PSB-603 und an CHO-hA₃-Zellen spezifische Bindung für [³H]PSB-11 gemessen werden. Bindungen der selektiven Radioliganden für die anderen Adenosinrezeptorsubtypen, die nicht in die Zellen transfiziert worden waren, waren vernachlässigbar. Einzig [³H]DPCPX zeigte an CHO-hA_{2B}-Zellen ebenfalls eine signifikante spezifische Bindung, was allerdings auch nicht überrascht, da die ebenfalls im nanomolaren Bereich liegende Affinität von DPCPX am A_{2B}AR hinlänglich bekannt ist (K_i an hA₁ = 3 nM im Vergleich zu K_i an hA_{2B} = 51 nM).¹⁷⁶ An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass mit diesem Assaydesign an intakten, vitalen Zellen nur antagonistisch wirksame Substanzen – sowohl Radioliganden als auch Testsubstanzen – vermessen werden können. Wie in **Abb. 2-15 A** deutlich sichtbar, zeigte zwar der A₁AR-selektive Antagonist-Radioligand [³H]DPCPX eine sehr signifikante spezifische Bindung, für den ebenfalls A₁-selektiven Agonist-Radioliganden [³H]CCPA allerdings war keinerlei spezifische Bindung zu messen. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Rezeptoren nach einer andauernden Agonistaktivierung sehr schnell desensibilisiert bzw. internalisiert werden und damit nicht mehr detektierbar sind. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Radioligand-Bindungsversuch an allen Adenosinrezeptoren intakter Zellen für Antagonistsubstanzen gut durchführbar ist und spezifische Bindung an ggf. vorhandenen Adenosinrezeptoren auf intakten Zellen detektiert werden kann. Die Versuche wurden daraufhin an intakten, primären humanen T-Lymphozyten durchgeführt – sowohl an unstimulierten, als auch an 36 h – 48 h mit PHA stimulierten Zellen. Die unspezifische Bindung wurde mittels den Subtypselektiven Antagonisten DPCPX (A₁), MSX-2 (A_{2A}), PSB-1115 (A_{2B}) und PSB-10 (A₃) bestimmt. Es konnten spezifische Bindungen für die Radioliganden [³H]MSX-2 und [³H]PSB-603 sowohl an unstimulierten als auch an PHA-stimulierten primären T-Lymphozyten gemessen werden, was auf eine Expression von A_{2A}- und A_{2B}-

Adenosinrezeptoren auf diesen Zellen schließen lässt. Für A_1 - und A_3 -Adenosinrezeptoren konnte keine spezifische Bindung detektiert werden (siehe **Abb. 2-16**). **Abb. 2-17** zeigt die Änderung der spezifischen Bindungen der Radioliganden, die mit einer PHA-Stimulierung der primären humanen T-Lymphozyten einhergehen. Dabei ist auch hier die schon vorher in der Literatur beschriebene^{126,131} bzw. im Rahmen dieser Arbeit auf mRNA-Ebene und an Membranpräparationen gezeigte, signifikant verstärkte Expression der A_{2A} -Adenosinrezeptoren infolge einer Stimulierung der Zellen zu sehen. Die Expression der A_1 - und A_3 -Adenosinrezeptorsubtypen ist auf stimulierten Zellen nicht verändert d.h. nicht detektierbar. Spezifische Bindung von [^3H]PSB-603 an A_{2B} -Adenosinrezeptoren konnte auch auf stimulierten Zellen nachgewiesen werden, die Expression der Rezeptoren ändert sich durch die Stimulierung der Zellen jedoch nur geringfügig, mit leichtem Trend zu einer Verringerung der Expression.

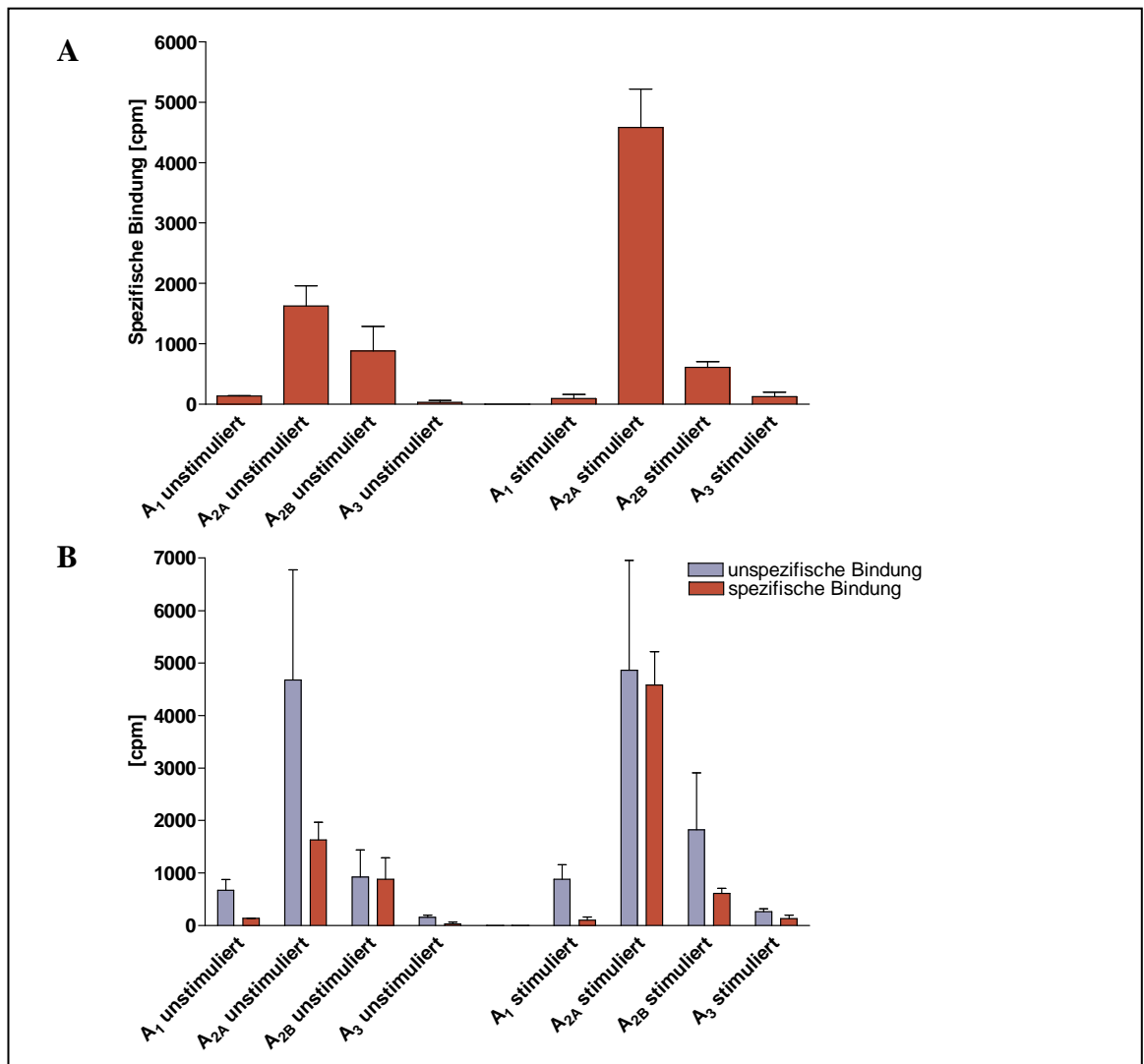


Abb. 2-16: A. Spezifische Bindung [cpm] und **B.** Spezifische und unspezifische Bindung [cpm] der Radioliganden (A_1 AR: [^3H]DPCPX, A_{2A} AR: [^3H]MSX-2, A_{2B} AR: [^3H]PSB-603, A_3 AR: [^3H]PSB-11) an intakten primären humanen T-Lymphozyten, unstimuliert bzw. PHA-stimuliert, $n=3 \pm \text{SEM}$.

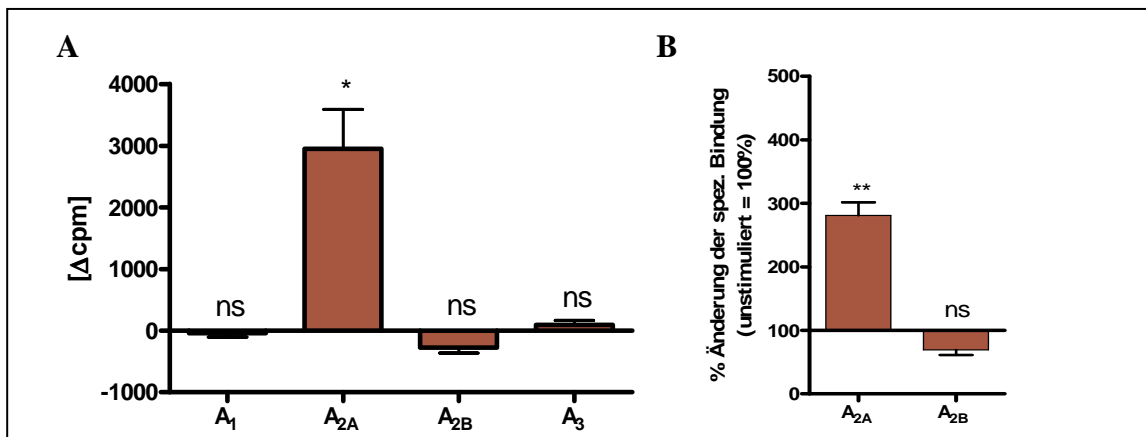


Abb. 2-17: Änderung der spezifischen Bindung der Radioliganden: [³H]DPCPX, A_{2A}AR: [³H]MSX-2, A_{2B}AR: [³H]PSB-603, A₃AR: [³H]PSB-11 an intakten primären humanen T-Lymphozyten infolge der PHA-Stimulierung. **A.** Änderung der cpm **B.** prozentuale Änderung, n=3 ± SEM.

Da bei den Radioligand-Bindungsversuchen sowohl an Membranpräparationen als auch an intakten primären humanen T-Lymphozyten relativ hohe unspezifische Bindungen gemessen wurden, war es nicht möglich, Sättigungsexperimente durchzuführen – sie werden üblicherweise zur Bestimmung der Bindungsparameter K_D (Affinität des Radioliganden) und B_{max} (Anzahl der vorhandenen spezifischen Bindungsstellen) herangezogen. Dabei wird die spezifische Radioligandbindung im Gleichgewicht bei verschiedenen eingesetzten Radioligandkonzentrationen bestimmt. Eine weitere Möglichkeit, die Zahl der Bindungsstellen und die Affinität des Radioliganden an den Rezeptor zu bestimmen, ist eine homologe Kompetition. Hierbei ist die eingesetzte Radioligandkonzentration konstant und konkurriert mit verschiedenen Konzentrationen der korrespondierenden Kaltsubstanz (die die gleiche Struktur besitzt, nur nicht radioaktiv markiert ist) um die Bindung. Da Radioligand und Kaltsubstanz chemisch identisch sind, spricht man von einer homologen Kompetition. Für die weiteren Berechnungen müssen dabei folgende Voraussetzungen erfüllt sein: 1.) die Rezeptoren zeigen eine identische Affinität für Radioligand und Kaltsubstanz, 2.) es liegt keine Kooperativität vor, d.h. die Bindung des Liganden an den Rezeptor beeinflusst seine Affinität an anderen Bindungsstellen nicht, 3.) die unspezifische Bindung ist proportional zur eingesetzten Konzentration des Radioliganden und 4.) es liegt keine Radioligand-„Depletion“ vor, d.h. es wird angenommen, dass nur ein sehr geringer Anteil der Liganden (sowohl des Radioliganden als auch des Kaltliganden) gebunden wird, oder anders formuliert man geht davon aus, dass die zugegebene Konzentration der Liganden annähernd gleich der freien Konzentration ist. Homologe Kompetitionen wurden im Rahmen dieser Arbeit an intakten, unstimulierten und PHA-stimulierten primären humanen

T-Lymphozyten mit Hilfe der Radioliganden [^3H]MSX-2 und [^3H]PSB-603 zur näheren Bestimmung der beobachteten Rezeptorexpression von A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren durchgeführt; die zugehörigen Bindungskurven sind in **Abb. 2-18** bzw. **2-19** dargestellt. Aus diesen Kurven lässt sich der Bindungsparameter IC_{50} entnehmen, der entsprechende K_D -Wert berechnet sich über Formel **[2-1]**, wobei der K_D -Wert die Konzentration darstellt, bei der 50% der Rezeptoren von einem Radioliganden besetzt sind:

$$\text{[2-1]} \quad K_D = \text{IC}_{50} - [\text{Radioligand}] \quad (\text{gilt nur für homologe Konkurrenz!})$$

Weiter lassen sich aus der homologen Konkurrenz B_{\max} -Werte berechnen, also die Anzahl der maximalen spezifischen Bindungsstellen im untersuchten Gewebe/in den untersuchten Zellen. Hierfür wird zuerst der B_{\max} -Wert, angegeben in cpm (*counts per minute*), berechnet **[2-2]**:

$$\text{[2-2]} \quad B_{\max} [\text{cpm}] = \frac{\text{spezifische Bindung} [\text{cpm}] \times \text{IC}_{50} [\text{nM}]}{\text{RL} [\text{nM}]}$$

Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden, der eingesetzten Proteinkonzentration bzw. Zellzahl, der Counter-Effizienz sowie des Umrechnungsfaktors von cpm in Bq kann der in cpm angegebene B_{\max} -Wert nach Formel **[2-3]** in fmol/mg Protein bei Membranpräparationen **[2-3A]** bzw. in Bindungsstellen/Zelle bei ganzen Zellen **[2-3B]** umgerechnet werden:

$$\text{[2-3A]} \quad B_{\max} [\text{fmol/mg Protein}] = \frac{B_{\max} [\text{cpm}] \times 100}{\text{Effizienz} \times 2.2 \times \text{spez. Akt.} [\text{Ci/mmol}] \times \text{Protein} [\text{mg}]}$$

$$\text{[2-3B]} \quad B_{\max} [\text{Bindungsstellen/Zelle}] = \frac{B_{\max} [\text{cpm}] \times 100}{\text{Effizienz} \times 2.2 \times \text{spez. Akt.} [\text{Ci/mmol}] \times \text{Zellzahl}}$$

Auf Grundlage der Formeln **[2-1]** - **[2-3]** wurden die K_D - und B_{\max} -Werte für die Radioliganden [^3H]MSX-2 und [^3H]PSB-603 an intakten primären humanen T-Lymphozyten bestimmt (siehe auch **Abb. 2-18** bzw. **2-19**); dabei ergaben sich die in **Tab. 2-6** dargestellten Werte.

Tab. 2-6: Zusammenfassung der durch homologe Konkurrenz ermittelten K_D und B_{max} -Werte für [3 H]MSX-2 und [3 H]PSB-603 an unstimulierten und PHA-stimulierten primären humanen T-Lymphozyten, $n=3 \pm \text{SEM}$.

| | K_D [nM] | B_{max} [Bindungsstellen/Zelle] |
|---|-------------------|--------------------------------------|
| [3 H]MSX-2 an unstimulierten Zellen | 3.57 ± 2.67 | 3581 ± 2280 |
| [3 H]MSX-2 an PHA-stimulierten Zellen | 2.58 ± 1.15 | 13588 ± 9939 |
| | ns, $P=0.7506$ | ns, $P=0.3820$ |
| [3 H]PSB-603 an unstimulierten Zellen | 0.680 ± 0.242 | 3240 ± 815 |
| [3 H]PSB-603 an PHA-stimulierten Zellen | 0.241 ± 0.108 | 3994 ± 1343 |
| | ns, $P=0.1729$ | ns, $P=0.6563$ |

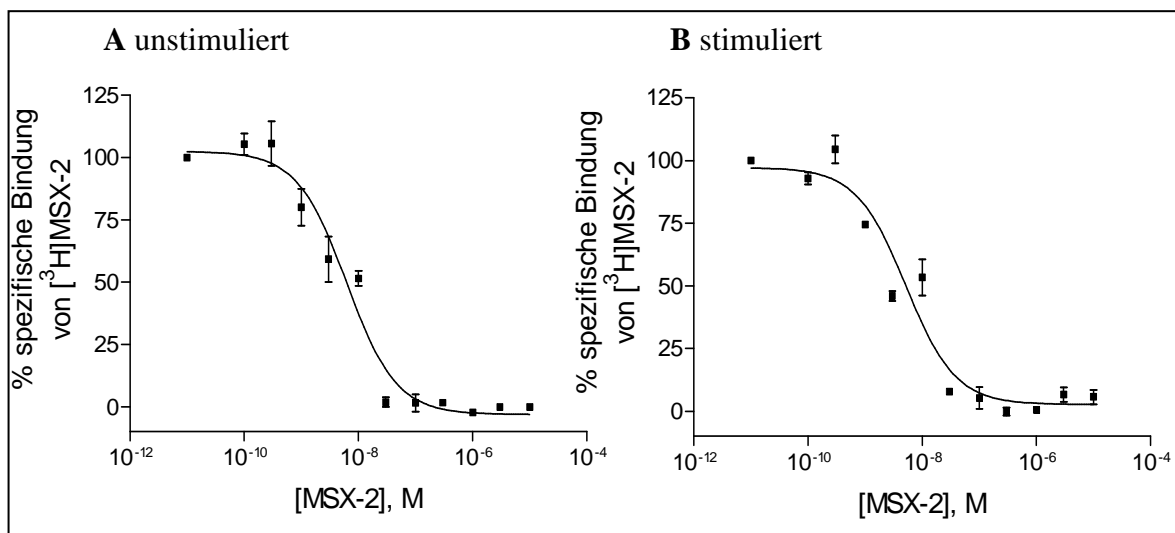


Abb. 2-18: Homologe Konkurrenz am A_{2A}-Adenosinrezeptor. Hemmung der [3 H]MSX-2-Bindung an **A.** unstimulierten **B.** PHA-stimulierten, intakten humanen T-Lymphozyten durch den Kaltliganden MSX-2, $n=3 \pm \text{SEM}$.

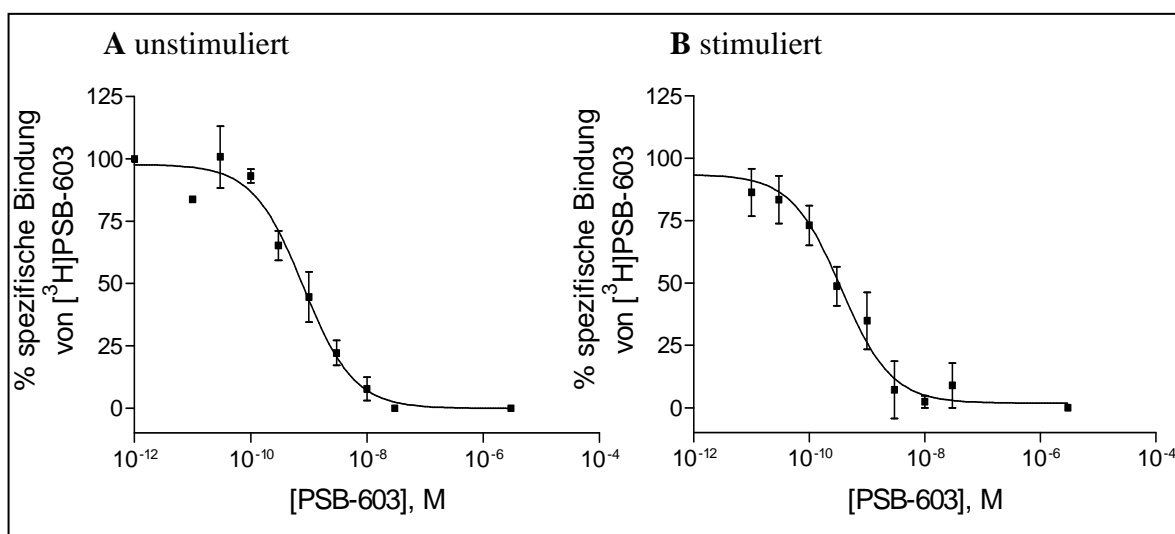


Abb. 2-19: Homologe Konkurrenz an A_{2B}-Adenosinrezeptoren. Hemmung der [3 H]PSB-603-Bindung an **A.** unstimulierten **B.** PHA-stimulierten, intakten humanen T-Lymphozyten durch den Kaltliganden PSB-603, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Mittels homologer Kompetition konnte also gezeigt werden, dass sich die Affinitäten der Radioliganden zu den A_{2A} - bzw. A_{2B} -Adenosinrezeptoren (dargestellt durch K_D -Werte der Radioliganden [3H]MSX-2 und [3H]PSB-603) durch eine Stimulierung der Zellen nicht signifikant verändern (3.57 nM zu 2.58 nM für [3H]MSX-2 bzw. 0.68 nM zu 0.24 nM für [3H]PSB-603) und in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen K_D -Werten der Radioliganden an den jeweiligen rekombinanten humanen Adenosinrezeptorsubtypen liegen (K_D [3H]MSX-2 an hA_{2A} = 7.3 nM,¹⁷⁷ K_D [3H]PSB-603 an hA_{2B} = 0.41 nM¹⁷⁸). Die B_{max} -Werte für den A_{2A} -Adenosinrezeptor steigen während der PHA-Stimulierung frisch isolierter primärer humaner T-Lymphozyten von 3581 auf 13588 Bindungsstellen bzw. Rezeptoren pro Zelle, also um das 3.8-fache an. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit den Werten, die aus der Änderung der spezifischen Bindung in cpm errechnet wurden (siehe **Abb. 2-19**), es ergab sich hierbei eine Erhöhung der spezifischen Bindung um 281%, also das 2.8-fache. Für A_{2B} -Adenosinrezeptoren konnte mittels homologer Kompetition eine Rezeptorexpression von 3240 Bindungsstellen/Zelle auf unstimulierten primären humanen T-Lymphozyten ermittelt werden, dieser Wert änderte sich durch PHA-Stimulierung der Zellen kaum (3994 Bindungsstellen/Zelle).

Varani *et al.* bestimmten mit Hilfe des A_{2A} -selektiven Antagonist-Radioliganden [3H]SCH-58261 einen B_{max} -Wert für A_{2A} -Adenosinrezeptoren auf humanen Lymphozyten von 35 fmol/mg Protein bei einem K_D -Wert von 0.85 nM,¹⁵⁷ ein Wert, der in sehr guter Übereinstimmung mit den K_D -Werten dieses Radioliganden an $A_{2A}AR$ in anderen Zellen/Geweben liegt. Auch die in Kompetitionsexperimenten bestimmten Affinitäten von einigen Standardagonisten und -antagonisten an Adenosinrezeptoren, wie z.B. **NECA**, **CGS21680**, **R-PIA**, **CGS15943**, **DPCPX** und anderen, stimmten sehr gut mit den Werten der Affinitäten für $A_{2A}AR$ in anderen Geweben überein.¹⁵⁷ Alles in allem fassten Gessi *et al.* die Datenlage damit zusammen, dass A_{2A} -Adenosinrezeptoren auf humanen Lymphozyten ein für A_{2A} -Adenosinrezeptoren typisches pharmakologisches und biochemisches Profil besitzen,¹⁶¹ eine Tatsache, die im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Auch für A_{2B} -Adenosinrezeptoren auf humanen Lymphozyten konnte ein für diesen Rezeptorsubtyp typisches pharmakologisches Profil bestimmt werden: Mit Hilfe von Real-time-PCR-Experimenten und des Radioliganden [3H]MRE 2029-F20 konnten Gessi *et al.* einen B_{max} -Wert für A_{2B} -Adenosinrezeptoren auf humanen Lymphozyten von 54 ± 8 fmol/mg Protein bei einem K_D -Wert von

2.7 ± 0.7 nM bestimmen.¹⁶⁰ An rekombinant in HEK293-Zellen exprimierten humanen A_{2B}AR besitzt [³H]MRE 2029-F20 einen K_D-Wert von 2.8 ± 0.2 nM. Auch mittels Konkurrenzexperimenten untersuchte Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten zeigten absolut die gleiche Reihenfolge ihrer Affinität mit K_i-Werten in den gleichen Konzentrationsbereichen an A_{2B}AR in humanen Lymphozyten, verglichen mit rekombinant exprimierten Rezeptoren.¹⁶⁰

Es lässt sich also festhalten, dass mittels Radioligand-Bindungsstudien Rezeptorexpression von A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren auf primären humanen T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten. Die A_{2A}AR-Expression verstärkt sich bei einer Stimulierung der Zellen um ca. das 3-fache, während die A_{2B}AR-Expression nahezu konstant bleibt. Eine Rezeptorexpression von A₁AR sowie A₃AR auf Proteinebene konnte mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien auf primären humanen T-Lymphozyten nicht nachgewiesen werden. Alle detektierten Rezeptoren scheinen ein für ihren Rezeptorsubtyp charakteristisches pharmakologisches und biochemisches Profil zu besitzen.

2.3.2 Adenosinrezeptorexpression auf Jurkat T-Zellen

Analog zur Bestimmung der Adenosinrezeptorexpression auf primären humanen T-Lymphozyten wurden auch an Jurkat T-Zellen Radioligand-Rezeptor-Bindungsversuche zur Bestimmung der spezifischen Bindungen durchgeführt, um damit Hinweise auf die Adenosinrezeptorexpression zu erlangen. Dafür wurden die Subtyp-selektiven Radioliganden [^3H]CCPA (A_1), [^3H]MSX-2 (A_{2A}), [^3H]PSB-603 (A_{2B}) und [^3H]PSB-11 (A_3) zunächst an Membranpräparationen der Zellen getestet. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindungen wurden hohe, mikromolare Konzentrationen der Substanzen **CADO**, **NECA**, **DPCPX** und **R-PIA** eingesetzt. Die Strukturformeln der Verbindungen sind in **Abb. 2-13** dargestellt.

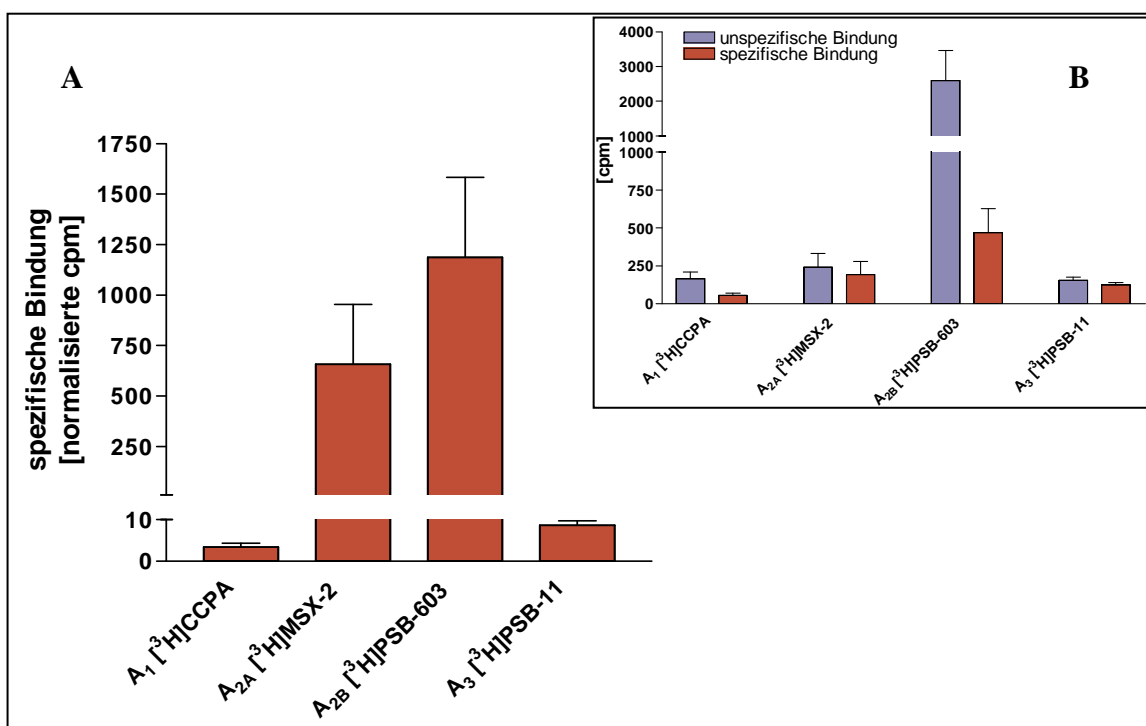


Abb. 2-20: **A** Unter Berücksichtigung der Affinität, der eingesetzten Konzentration und der spezifischen Aktivität der Radioliganden berechnete, „normalisierte“ spezifische Bindung und **B** tatsächlich gemessene spezifische und unspezifische Bindung der Radioliganden (A_1 AR: [^3H]CCPA, A_{2A} AR: [^3H]MSX-2, A_{2B} AR: [^3H]PSB-603, A_3 AR: [^3H]PSB-11) an Jurkat T-Zell-Membranpräparationen, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Die aus diesen Versuchen gewonnenen, tatsächlich gemessenen spezifischen Bindungen in cpm (siehe **Abb. 2-20 B**) wurden zur besseren Vergleichbarkeit in Abhängigkeit der Affinität, der eingesetzten Konzentration sowie der spezifischen Aktivität der Radioliganden gesetzt, woraus sich die in **Abb. 2-20 A** dargestellten, „normalisierten“ cpm-Werte ergaben. Diese wurden dabei nach Gleichung [2-4] berechnet.

$$[2-4] \text{ spezifische Bindung (normalisierte cpm)} = \frac{\text{cpm (gemessen)} \times K_D}{\text{spez. Aktivität} \times [\text{RL}]}$$

Wie aus **Abb. 2-20 A** ersichtlich, konnte an Jurkat T-Zellen die höchste spezifische Bindung für [³H]PSB-603 an A_{2B}AR, gefolgt von der spezifischen Bindung für [³H]MSX-2 an A_{2A}-Adenosinrezeptoren gemessen werden. Für die Radioliganden [³H]CCPA und [³H]PSB-11 an A₁- bzw. A₃-Adenosinrezeptoren konnten – wenn überhaupt – nur marginale spezifische Bindungen bestimmt werden. Ein Bild, das schon bei den Messungen an primären humanen T-Lymphozyten beobachtet werden konnte. Um A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren näher zu charakterisieren und K_D- bzw. B_{max}-Werte zu berechnen, wurde aufgrund der relativ hohen unspezifischen Bindungen (siehe **Abb. 2-20 B**) auch hier anstelle von Sättigungsexperimenten eine homologe Kompetition mit Hilfe der Radioliganden [³H]MSX-2 und [³H]PSB-603 an Jurkat T-Membranpräparationen durchgeführt. Die zugehörigen Bindungskurven sind in **Abb. 2-21** dargestellt.

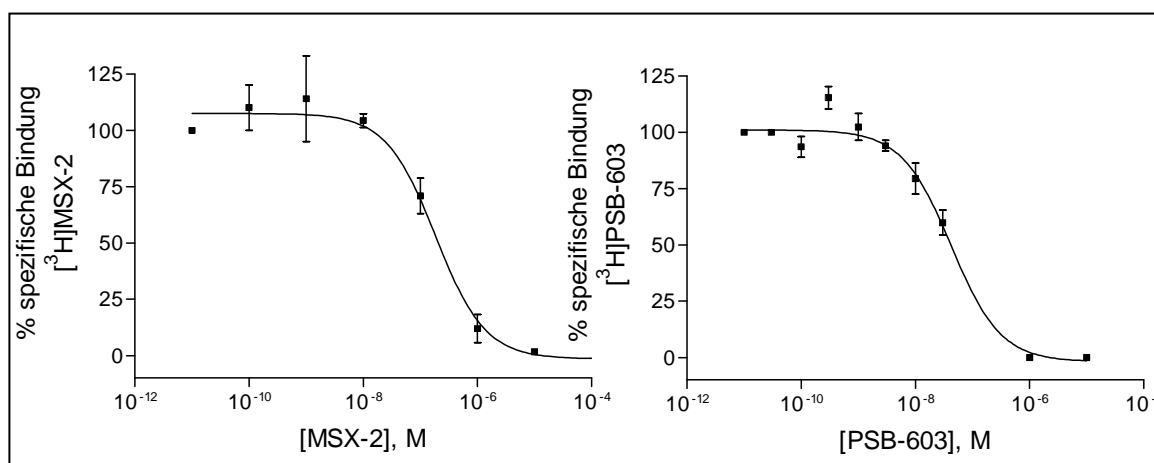


Abb. 2-21: Homologe Kompetition an A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen. Hemmung der [³H]MSX-2- bzw. [³H]PSB-603-Bindung an einer Jurkat T-Zell-Membranpräparation durch die jeweiligen Kaltliganden MSX-2 und PSB-603. Die Kurve von PSB-603 ist aufgrund beschränkter Löslichkeit der Substanz extrapoliert; n=3 ± SEM.

Tab. 2-7: Zusammenfassung der durch homologe Kompetition ermittelten K_D- und B_{max}-Werte für [³H]MSX-2 und [³H]PSB-603 an Jurkat T-Zellmembranen, n=3 ± SEM.

| | K _D [nM] | B _{max} [pmol/mg Protein] |
|--------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| [³ H]MSX-2 an Jurkat T | 287 ± 40 | 4.56 ± 3.65 |
| [³ H]PSB-603 an Jurkat T | 55.4 ± 0.6 | 75.5 ± 20.5 |

Daraus ergeben sich die in **Tab. 2-7** dargestellten Bindungsparameter. Die Rezeptorexpressionen von 4.56 pmol/mg Protein (A_{2A}) und 75.5 pmol/mg Protein (A_{2B}) sind allgemein für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vergleichsweise hoch, sie liegen jedoch in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Werten für die A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptorexpression auf Jurkat T-Zellen (siehe **Tabelle 2-8**). Gessi *et al.* fanden mit Hilfe des Radioliganden [3H]SCH-58261 ($K_D = 2.5 \pm 0.3$ nM) eine A_{2A} AR-Bindungsstellenzahl von 1.4 ± 0.2 pmol/mg Protein,¹⁶⁴ Daniela Bertarelli konnte mit Hilfe von [3H]MSX-2 einen B_{max} -Wert von 0.531 ± 0.155 pmol/mg Protein an A_{2A} AR auf Jurkat T-Zellen identifizieren.¹⁶⁶ Für A_{2B} -Adenosinrezeptoren konnten B_{max} -Werte von 92 ± 9 pmol/mg Protein ([3H]PSB-298, K_D an rekombinanten humanen A_{2B} AR = 60 nM¹⁷⁹) bzw. 10 ± 2 pmol/mg Protein ([3H]ZM241385, K_D an rekombinanten humanen A_{2B} AR = 33.6 nM¹⁸⁰) bestimmt werden.¹⁶⁶ Auch diese Werte liegen in sehr guter Übereinstimmung mit dem im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Wert von 75.5 pmol/mg Protein (siehe **Tabelle 2-8**). Die geringe Rezeptorexpression von A_1 - und A_3 -Adenosinrezeptoren wurden ebenfalls bereits früher beobachtet: für A_1 AR war mittels [3H]CCPA ein B_{max} -Wert von 16 ± 5 fmol/mg und für A_3 AR mit [3H]PSB-11 ein B_{max} -Wert von 13 ± 2 fmol/mg Protein ermittelt worden.¹⁶⁶ In **Abb. 2-22** sind die von Daniela Bertarelli mittels Sättigungsexperimenten ermittelten Rezeptordichten B_{max} [fmol/mg] der vier nativ in Jurkat T-Zellen exprimierten Adenosinrezeptorsubtypen im Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten, nach Gleichung [2-4] normalisierten spezifischen Bindungen dargestellt. Es lässt sich ein gut vergleichbares Verhältnis der Rezeptorexpressionen feststellen, es handelt sich also offensichtlich um denselben Jurkat T-Zellklon.

Mirabet *et al.* fanden ebenfalls in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit dem unselektiven Agonist-Radioliganden [3H]NECA eine Adenosinrezeptorexpression auf Jurkat T-Zellen im pikomolaren Bereich: Der bestimmte B_{max} -Wert betrug 1.1 ± 0.5 pmol/mg Protein bei einem K_D von 1.2 – 1.5 μ M (siehe **Tab. 2-8**).⁶⁴ Sie ordneten diese Werte einer Bindung an A_{2B} -Adenosinrezeptoren zu, da die Bindungen der A_1 -, A_{2A} - bzw. A_3 -selektiven Radioliganden [3H]DPCPX, [3H]CGS21680 bzw. [3H]R-PIA vernachlässigbar waren.

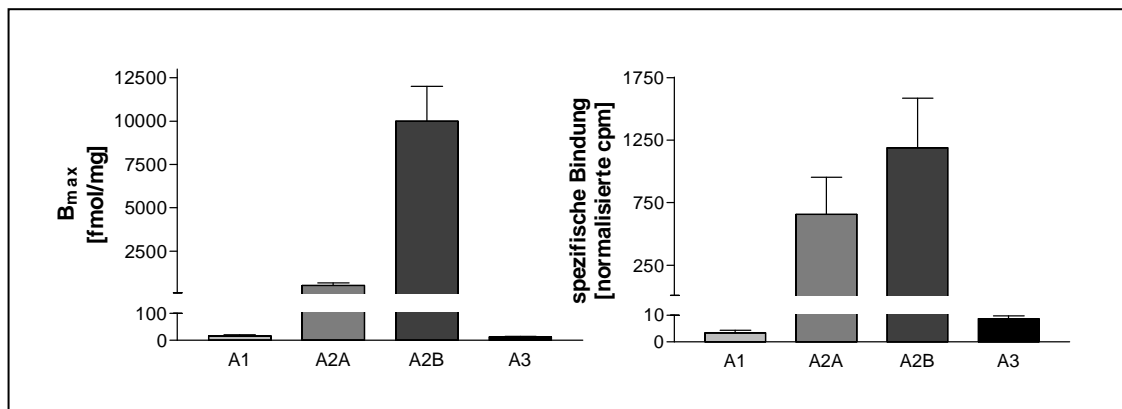


Abb. 2-22: Gegenüberstellung der in der Literatur beschriebenen Rezeptordichten $[B_{\max}]^{166}$ mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten, spezifischen Bindungen [normalisierte cpm] der vier nativ in Jurkat T-Zellen exprimierten Adenosinrezeptorsubtypen, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Tab. 2-8: Zusammenfassung der in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien bestimmten Rezeptordichten der vier nativ in Jurkat T-Zellen exprimierten Adenosinrezeptorsubtypen $[B_{\max}]$ und Affinitäten der eingesetzten Radioliganden $[K_D]$

| Radioligand | | | K_D [nM] | B_{\max} [pmol/mg] |
|-------------|------------|----------------------------------|---|--|
| ns* | Agonist | $[^3\text{H}]\text{NECA}$ | 1200 – 1500 ⁶⁴ | 1.1 (A_{2B}) ⁶⁴ |
| A_1 | Agonist | $[^3\text{H}]\text{CCPA}$ | 2.6 ¹⁶⁷ | 0.016 ¹⁶⁷ |
| | Antagonist | $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ | 0.9 ^{164, a} | 0.042 ^{164, a} |
| | | | Bindung vernachlässigbar ⁶⁴ | |
| A_{2A} | Agonist | $[^3\text{H}]\text{CGS21680}$ | K_D nicht bestimmbar, unspez. Bindung zu hoch ¹⁶³ | 100–1000 ¹⁶³ (Bindungsstellen/Zelle) |
| | | | Bindung vernachlässigbar ⁶⁴ | |
| | Antagonist | $[^3\text{H}]\text{MSX-2}$ | 287 | 4.56 |
| | | $[^3\text{H}]\text{SCH-58261}$ | 36 ¹⁶⁷ 2.5 ^{164, a} | 0.531 ¹⁶⁷ 1.4 ^{164, a} |
| A_{2B} | Antagonist | $[^3\text{H}]\text{PSB-298}$ | 495 ¹⁶⁷ | 92 ¹⁶⁷ |
| | | $[^3\text{H}]\text{ZM241385}$ | 327 ¹⁶⁷ | 10 ¹⁶⁷ |
| | | $[^3\text{H}]\text{PSB-603}$ | 55.4 | 75.5 |
| A_3 | Agonist | $[^3\text{H}]\text{R-PIA}$ | Bindung vernachlässigbar ⁶⁴ | |
| | Antagonist | $[^3\text{H}]\text{MRE3008 F20}$ | 1.7 (Kinetik) 1.9 (Sättigung) ^{164, a} | 1.3 ^{164, a} |
| | | $[^3\text{H}]\text{PSB-11}$ | 3.7 ¹⁶⁷ | 0.013 ¹⁶⁷ |

* ns = nicht selektiv

^a Bei dieser Studie wurde ein Jurkat T-Zellklon eingesetzt, dessen Expressionsmuster ($A_{2A} \approx A_3 \gg A_1$) sich von dem in den anderen Studien verwendeten Klon unterscheidet. $A_{2B}\text{AR}$ konnten aufgrund eines fehlenden selektiven Radioliganden für diesen Subtyp nicht mit in die Studie aufgenommen werden, es konnte jedoch mittels PCR-Experimenten die mRNA-Expression für $A_{2B}\text{AR}$ nachgewiesen werden, allerdings ist eine quantitative Aussage nicht möglich.

Auffallend sind die vergleichsweise sehr niedrigen Affinitäten der Radioliganden sowohl an A_{2A} - als auch an A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen. Für [^3H]MSX-2 konnte ein K_D -Wert von 287 nM an A_{2A} AR in Jurkat T-Zellmembranen bestimmt werden, in der Literatur ist mit einem K_D von 7.3 nM für [^3H]MSX-2 an humanen, rekombinanten A_{2A} -Adenosinrezeptoren eine ca. 40-fach höhere Affinität beschrieben. Noch eklatantere Unterschiede zeigen sich am A_{2B} -Adenosinrezeptor: Sonja Hinz konnte im Rahmen ihrer Diplomarbeit einen K_D -Wert von 0.41 nM für [^3H]PSB-603 an humanen, rekombinanten A_{2B} -Adenosinrezeptoren bestimmen,¹⁷⁸ also eine 135-fach höhere Affinität als die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Affinität mit einem K_D -Wert von ca. 55 nM. Um diese Beobachtungen näher zu untersuchen, wurden die Affinitäten weiterer Testsubstanzen an A_{2A} - bzw. A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellmembranen bestimmt (siehe **Kapitel 2.3.3**).

Im Anschluss an Bindungsstudien mit Jurkat T-Zellmembranpräparationen wurden Radioligand-Rezeptor-Bindungsversuche an intakten Jurkat T-Zellen nach dem etablierten Protokoll für primäre humane T-Lymphozyten durchgeführt. Dabei konnte jedoch keinerlei spezifische Bindung für die vier Adenosinrezeptorsubtypen gemessen werden. Weder ein erstes Variieren der eingesetzten Radioligandkonzentrationen, der eingesetzten Zellzahl noch der Inkubationsdauer brachte einen Anstieg der spezifischen Bindungen, einzig die unspezifische Bindung veränderte sich.

Es lässt sich also festhalten, dass mittels Radioligand-Bindungsstudien Rezeptorexpressionen von A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellmembranpräparationen festgestellt werden konnten, wobei der A_{2B} AR am stärksten exprimiert wird, gefolgt von der Expression des A_{2A} AR, der einen 16.5-fach niedrigeren B_{\max} -Wert aufweist. Eine Rezeptorexpression von A_1 AR sowie A_3 AR auf Proteinebene konnte in Jurkat T-Zellmembranen nur sehr schwach – wenn überhaupt – nachgewiesen werden, eine Tatsache die sich schon auf primären humanen T-Lymphozyten gezeigt hatte. Das ermittelte Rezeptorexpressionsmuster ist nahezu identisch mit dem von Daniela Bertarelli beschriebenen Muster (siehe **Abb. 2-22**). Es kann also davon ausgegangen werden, dass derselbe Jurkat T-Zellklon vorlag, der seine Rezeptorexpression sehr konstant behalten hat, was für nativ exprimierte Rezeptoren auch zu erwarten war. Dieser Zellklon scheint sich von dem von Gessi et al. verwendeten Jurkat T-Zellklon eindeutig in der Adenosinrezeptorexpression zu unterscheiden.^{164,167} Weitere Untersuchungen zur Klärung der

Tatsache, dass die eingesetzten Radioliganden [³H]MSX-2 und [³H]PSB-603 vergleichsweise sehr niedrige Affinitäten an A_{2A}- bzw. an A_{2B}-Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen zeigen, sind notwendig. Dafür sollten die Affinitäten weiterer Testsubstanzen an A_{2A}- bzw. A_{2B}-Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellmembranen bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Kapitel 2.3.3** dargestellt. Die relativ niedrige Affinität der Radioliganden ist vermutlich der Grund dafür, dass es nicht gelungen ist, Radioligandbindungsstudien an intakten Jurkat T-Zellen zu etablieren. In Membranpräparationen sind wesentlich mehr Rezeptoren als in intakten Zellen vorhanden, weshalb das Signal einfacher zu messen und das Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung wesentlich größer ist.

2.3.3 Bestimmung der Affinitäten verschiedener Adenosinrezeptorliganden an Jurkat T-Zellen

Im vorhergehenden **Kapitel 2.3.2** konnte gezeigt werden, dass die beiden Radioliganden [^3H]MSX-2 und [^3H]PSB-603 an Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellmembranen eine deutlich verminderte Affinität im Vergleich zu den Affinitäten dieser Radioliganden an rekombinanten humanen Adenosinrezeptoren aufweisen. Deshalb sollten nun weitere $\text{A}_{2\text{A}}$ - bzw. $\text{A}_{2\text{B}}$ -selektive Liganden im Hinblick auf ihre Affinität an Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen getestet werden und die Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen Werten für diese Verbindungen an den entsprechenden Rezeptoren, exprimiert in anderen, nativen oder rekombinanten Zellsystemen, verglichen werden.

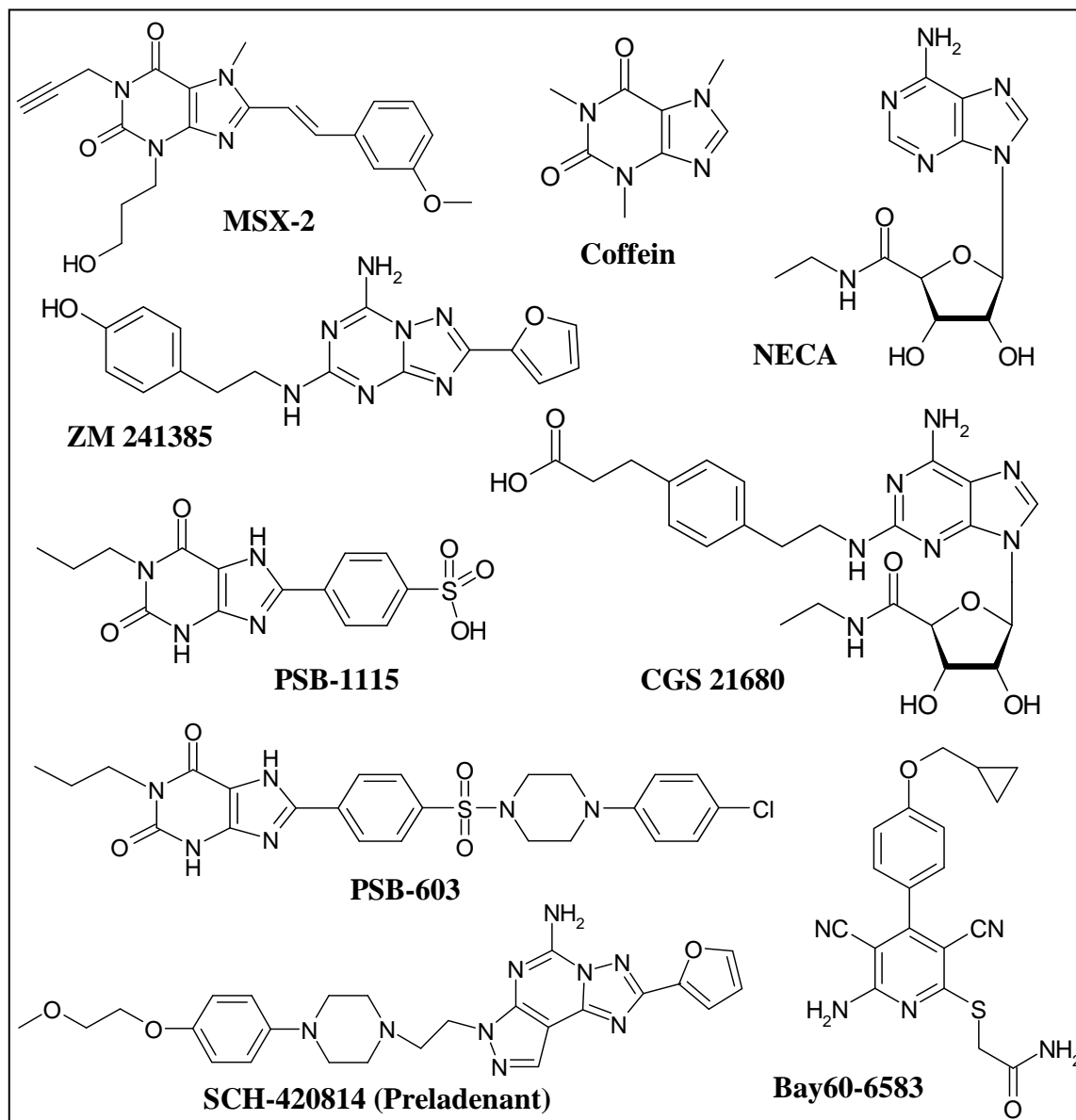


Abb. 2-23: Strukturformeln der in den Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranpräparationen von Jurkat T-Zellen untersuchten Adenosinrezeptorliganden.

Tab. 2-9: Affinitäten verschiedener Adenosinrezeptorliganden an humanen A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen verglichen mit Literaturwerten anderer humaner (rekombinanter oder nativer) Testsysteme.

| | A _{2A} vs. [³ H]MSX-2 | | | A _{2B} vs. [³ H]PSB-603 | | |
|-------------------|--|---|--------|--|--|--------|
| | K _i ± SEM [nM] | K _i ± SEM [nM] (Literatur) | Faktor | K _i ± SEM [nM] | K _i ± SEM [nM] (Literatur) | Faktor |
| NECA | 22200 ± 2800 | 66 ^{184 a} 11.6 ^{177 b} | 400 | 14700 ± 2200 | 361 ^{180 c} 1850 ^{186 d} 1893 ^{178 e} | 10 |
| MSX-2 | 287 ± 40 | 7.3 (K _D) ¹⁷⁷ | 40 | n.d. | -- | -- |
| CGS21680 | 192000 ± 91000 | 221 ^{184 a} | 850 | n.d. | -- | -- |
| ZM241385 | 49.8 ± 19.8 | 0.8 ^{183 a} 0.84 (K _D) ¹⁷⁷ | 60 | n.d. | -- | -- |
| SCH-420814 | 15500 ± 3700 | 1.1 ^{182 a} | 14000 | n.d. | -- | -- |
| Coffein | > 100000 | 23400 ^{181 b} 5520 ^{177 b} | > 10 | > 100000 | 20500 ^{181 d} 33800* ^e | > 5 |
| BAY60-6583 | n.d. | -- | -- | 12000 ± 3800 | 212 ^{178 e} | 50 |
| PSB-1115 | n.d. | -- | -- | 5300 ± 2700 | 53.4 ^{185 c} 237, 152* ^e | 40 |
| PSB-603 | n.d. | -- | -- | 55.4 ± 0.6 | 0.55 ^{178 e} | 100 |

a [³H]SCH58261, *b* [³H]MSX-2, *c* [³H]ZM241385, *d* [³H]PSB-298, *e* [³H]PSB-603, * unveröffentlichte Ergebnisse aus dem Arbeitskreis

Dabei kamen die in **Abb. 2-23** dargestellten Verbindungen zum Einsatz. Es wurde neben dem unselektiven Agonisten *N*-Ethylcarboxamidoadenosin **NECA**, einem metabolisch stabilen 5'-substituierten Adenosinderivat, der ebenfalls unselektive Antagonist **Coffein** (1,3,7-Trimethylxanthin) an beiden Rezeptorsubtypen getestet. Als selektive Agonisten wurden das A_{2A}-selektive 2-Arylalkylamino-substituierte Adenosinderivat **CGS 21680** (am A_{2B}AR inaktiv) sowie das A_{2B}-selektive Pyridin-3,5-dicarbonitril-Derivat **BAY60-6583** eingesetzt. **BAY60-6583** ist einer der wenigen Adenosinrezeptor-Agonisten, die sich strukturell nicht vom Adenosin ableiten. Untersuchte selektive Antagonisten am A_{2A}AR waren das 8-Styryl-Xanthinderivat **MSX-2**, das Triazolotriazin **ZM 241385** sowie das Arylpiperazinderivat des Pyrazolo[4,3-*e*]-1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pyrimidins (**SCH-420814**), welches sich unter dem INN-Namen **Preladenant** bereits in der klinischen Prüfung zur Therapie der Parkinson'schen Krankheit befindet. Eingesetzte A_{2B}-selektive Antagonisten waren die 1,8-disubstituierten Xanthinderivate **PSB-1115** und **PSB-603**. Die Verbindungen wurden jeweils an den Subtypen getestet, für die sie selektiv sind. Es wurden Konkurrenzexperimente mit den Radioliganden [³H]**MSX-2** bzw. [³H]**PSB-603** durchgeführt, aus denen die IC₅₀-Werte abgeleitet werden konnten. Zur weiteren Berechnung der daraus resultierenden, versuchsunabhängigen K_i-Werte wurden die im Rahmen dieser Arbeit mittels homologer Konkurrenz ermittelten K_D-Werte 287 nM für [³H]**MSX-2** bzw. 55 nM für [³H]**PSB-603** an humanen A_{2A}- bzw. A_{2B}-Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in **Tab. 2.9** dargestellt.

Es zeigt sich ausnahmslos für alle untersuchten Verbindungen, dass auch deren Affinität an nativ in Jurkat T-Zellen exprimierten A₂-Adenosinrezeptoren im Vergleich zu den humanen rekombinanten bzw. nativ in anderen Zellsystemen exprimierten Pendants deutlich vermindert ist. Dabei reichen die Unterschiede von Faktor 10 - 40 für **MSX-2** an A_{2A}AR bzw. **BAY60-6583**, **PSB-1115** und **NECA** an A_{2B}AR bis zu einem fast vollständigen Affinitätsverlust (Verminderung um den Faktor 14000) für **SCH-420814** an A_{2A}AR. Sowohl Agonisten als auch Antagonisten zeigen stark verringerte Affinitäten zu den in Jurkat T-Zellen exprimierten A_{2A}- bzw. A_{2B}-Adenosinrezeptoren im Vergleich zu den einzelnen, rekombinant oder nativ exprimierten Subtypen derselben Spezies. Auffallend ist an den Daten an A_{2A}AR, dass vor allem Agonisten (**NECA**, **CGS21680**) und das Adeninanalogue (**SCH-420814**) die stärkste Verringerung der Affinitäten mit Faktoren >>100 zeigen.

In **Tab. 2-10** sind Affinitätsdaten aus Radioligand-Bindungsstudien und in **Tab. 2-11** funktionelle Daten ausgewählter Verbindungen an A_2 -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen im Vergleich zu Daten dieser Substanzen an A_2 -Adenosinrezeptoren in anderen Zellsystemen dargestellt. Dabei handelt es sich um Zelllinien, die entweder beide A_2 AR-Subtypen endogen koexprimieren – allerdings in unterschiedlichen Verhältnissen – wie die humane Mastzelllinie HMC-1 ($A_{2A} \approx A_{2B}$), native Lymphozyten ($A_{2A} \approx A_{2B}$), die Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie PC12 ($A_{2A} > A_{2B}$) sowie um Zelllinien, die nur einen Adenosinrezeptorsubtyp nativ (murine Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3, A_{2B}) oder rekombinant exprimieren.

Erste Hinweise auf diese Besonderheit in Jurkat T-Zellen berichteten schon 1996 Van der Ploeg *et al.*, die in einem Vergleich von A_2 -Adenosinrezeptoren auf PC12-Zellen (Phäochromozytom-Zellen aus dem chromaffinen Gewebe des Nebennierenmarks der Ratte) mit denen auf Jurkat T-Zellen deutliche Affinitäts- und funktionelle Unterschiede der eingesetzten Testsubstanzen (**NECA**, ($[^3H]$)**CGS21680** u.a.) feststellen konnten (siehe **Tab. 2-10** und **11**). Sie erklärten diese Sachlage damit, dass in beiden Zelllinien A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren koexistieren, allerdings in sehr unterschiedlichen Dichten. So wurden in Jurkat T-Zellen signifikant mehr A_{2B} AR und in PC12-Zellen signifikant mehr A_{2A} AR gefunden,¹⁶³ was die Pharmakologie unter Umständen beeinflussen kann, vor allem für nicht ausreichend selektive A_2 -Adenosinrezeptorliganden, die bei unterschiedlicher Rezeptorexpression die beiden Subtypen in unterschiedlichem Ausmaß aktivieren können. Auch Unterschiede in den Signaltransduktionswegen der beiden Zelllinien werden diskutiert, so wären z.B. Unterschiede in der G-Protein-Kopplung, der Adenylatcyclase oder der Phosphodiesterasen denkbar.

Tab. 2-10: Zusammenfassung der in Radioligand-Bindungsstudien bestimmten K_i -Werte ausgewählter Verbindungen an A_{2A} AR und A_{2B} AR in Zelllinien, die jeweils beide A_2 AR-Subtypen endogen koexpressieren, allerdings in unterschiedlichen Expressionsdichten.

| Radioligand-Bindungsstudien | | | | | |
|--|--|------------------------------------|---|--|--|
| K_i [nM] | | | | | |
| | Zelllinie* | | | | |
| | Jurkat T ($A_{2A} < A_{2B}$) | HMC-1 ($A_{2A} \quad A_{2B}$) | Lymphozyten ($A_{2A} \approx A_{2B}$) | PC12 ($A_{2A} > A_{2B}$) | rekombinant (A_{2A} oder A_{2B}) |
| A_{2A}/A_{2B}-unselektiv | | | | | |
| NECA | 22200 ^b (A_{2A}) 14700 ^e (A_{2B}) | n.b. | 22 ^{a,F} (A_{2A}) 340 ^{c,G} (A_{2B}) | 160 ^{a,H} (A_{2A}) 3.9 ^{g,E} (A_{2A}) 1451 ^{a,O} (A_{2A}) | 66 ^{a,H} (A_{2A}) 20 ^{g,W} (A_{2A}) 330 ^{f,W} (A_{2B}) 262 ^{c,G} (A_{2B}) 260 ^{c,D} (A_{2B}) 330 ^{f,B} (A_{2B}) |
| Coffein | > 100000 ^b (A_{2A}) > 100000 ^e (A_{2B}) | n.b. | n.b. | 8182 ^{a,H} (A_{2A}) 95700 ^{g,E} (A_{2A}) | 2396 ^{a,H} (A_{2A}) |
| Theophyllin | n.b. | n.b. | 7900 ^{c,G} (A_{2B}) | 31000 ^{g,E} (A_{2A}) | 2400 ^{d,D} (A_{2A}) 6700 ^{c,G} (A_{2B}) 4800 ^{c,D} (A_{2B}) 7850 ^{f,B} (A_{2B}) |
| ZM241385 | 49.8 ^b (A_{2A}) 327 ^{d,M} | 1.92 ^{d,D} (A_{2A}) | 18 ^{c,G} (A_{2B}) | n.b. | 0.8 ^{a,P} (A_{2A}) 9.0 ^{c,G} (A_{2B}) 31.6 ^{f,B} (A_{2B}) |
| DPCPX | n.b. | n.b. | 492 ^{a,F} (A_{2A}) 45 ^{c,G} (A_{2B}) | 323 ^{a,H} (A_{2A}) | 284 ^{a,H} (A_{2A}) 35 ^{c,G} (A_{2B}) |
| A_{2A}-selektiv | | | | | |
| CGS21680 | 192000 ^b nicht bestimmbar ^{h,A} | n.b. | 838 ^{a,F} | 298 ^{a,H} 5.9 ^{g,E} 6.7 ^{h,E} 218 ^{a,O} | 221 ^{a,H} (A_{2A}) |
| MSX-2 | 287 ^b 36 ^{b,M} | n.b. | n.b. | n.b. | 7.3 ^{b,N} (A_{2A}) |
| SCH420814 | 15500 ^b | n.b. | n.b. | n.b. | 1.1 ^{a,K} (A_{2A}) |
| SCH58261 | 2.5 ^{a,Q} | n.b. | 0.85 ^{a,F} | 3.5 ^{a,H} 0.68 ^{a,O} | 1.5 ^{d,D} (A_{2A}) 0.6 ^{a,P} (A_{2A}) 1.1 ^{a,H} (A_{2A}) |
| A_{2B}-selektiv | | | | | |
| PSB-1115 | 5300 ^e | n.b. | n.b. | n.b. | 237 ^{e,X} (A_{2B}) 152 ^{e,X} (A_{2B}) |
| PSB-603 | 55.4 ^e | n.b. | n.b. | n.b. | 0.55 ^{e,X} (A_{2B}) |
| BAY60-6583 | 12000 ^e | n.b. | n.b. | n.b. | 212 ^{e,X} (A_{2B}) |

n.b., nicht bestimmt, a vs. [³H]SCH58261, b vs. [³H]MSX-2, c vs. [³H]MRE2029 F20, d [³H]ZM241385, e vs. [³H]PSB-603, f vs. [¹²⁵I]ABOPX, g vs. [³H]NECA, h [³H]CGS21680 A-X siehe Anhang **Tabelle 2-11**

* **Jurkat T**: humane Leukämie T-Zelllinie, A_{2A} 0.5-4.6 pmol/mg A_{2B} 10-92 pmol/mg, **HMC-1**: humane Mastzelllinie, A_{2A} 72 fmol/mg A_{2B} 128 fmol/mg **PC12**: Ratten-Phäochromozytomazellen, A_{2A} 196 fmol/mg A_{2B} nicht quantitativ bestimmt, **Lymphozyten**: primäre humane Lymphozyten, A_{2A} 35 fmol/mg A_{2B} 54 fmol/mg.

Tab. 2-11: Zusammenfassung der in funktionellen Studien (cAMP-, $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen) bestimmten Aktivitäten $[EC_{50}/IC_{50}/K_B$ -Werte] ausgewählter Verbindungen an $A_{2A}AR$ und $A_{2B}AR$ in Zelllinien, die jeweils beide A_2AR -Subtypen endogen - in unterschiedlichen Expressionsdichten - koexprimieren.

| | Funktionelle Testungen | | | | | |
|--|---|--|---|---|---|---|
| | $EC_{50}/IC_{50}/K_B$ [nM] | | | | | |
| | Zelllinie* | | | | | |
| | Jurkat ($A_{2A} < A_{2B}$) | NIH 3T3 (A_{2B}) | HMC-1 (A_{2A} A_{2B}) | Lymphoz. ($A_{2A} \approx A_{2B}$) | PC12 ($A_{2A} > A_{2B}$) | rekomb. (A_{2A}/A_{2B}) |
| A_{2A}/A_{2B}-unselektiv | | | | | | |
| NECA | 6300 ^{b,S} 2810 ^b 5800 ^{a,A} 3980 ^{a,R} (A_{2B}) | 1900 ^{a,d,L} 460 ^{a,e,L} | 420 ^{a,D} (A_{2B}) 200 ^{a,g,C} 334 ^{b,T} 225 ^{a,T} | 200 ^{a,F} | 211 ^{a,c,E} 49,4 ^{a,H} 130 ^{a,L} 200 ^{a,A} | 152 ^{a,D} (A_{2B}) 26,1 ^{a,H} (A_{2A}) 1400 ^{a,V} (A_{2B}) |
| Coffein | n.b. | 30000 ^{a,d,L} 13000 ^{a,e,L} | n.b. | n.b. | 44000 ^{a,E} (A_{2A}) 37100 ^{a,I} 18493 ^{a,H} 36000 ^{a,J,L} | 12330 ^{a,H} (A_{2A}) 12300 ^{a,U} (A_{2A}) 15500 ^{a,U} (A_{2B}) |
| Theophyllin | n.b. | 32000 ^{a,d,L} 4900 ^{a,e,L} | n.b. | n.b. | 20300 ^{a,E} (A_{2A}) 17000 ^{a,I} 4186 ^{a,H} | 7940 ^{a,H} (A_{2A}) 7900 ^{a,U} (A_{2A}) 4800 ^{a,U} (A_{2B}) |
| CGS15943 | n.b. | 41 ^{a,d,L} | n.b. | 12 ^{a,F} | 1,4 ^{a,H} 1,9 ^{a,L} | 0,63 ^{a,H} (A_{2A}) 44 ^{a,P} (A_{2B}) |
| DPCPX | n.b. | n.b. | n.b. | 600 ^{a,F} | 98 ^{a,H} | 20 ^{a,H} (A_{2A}) |
| A_{2A}-selektiv | | | | | | |
| CGS21680 | 4400 ^{a,A} | n.b. | 60 ^{a,D} 22 ^{a,C} 296 ^{b,T} 54 ^{a,T} | 897 ^{a,F} | 72 ^{a,E} 129 ^{a,H} 74 ^{a,L} 24 ^{a,A} | 36,8 ^{a,H} (A_{2A}) |
| SCH58261 | n.b. | n.b. | 0,1 ^{a,C} | 16 ^{a,F} | 5,8 ^{a,H} | 6,63 ^{a,H} (A_{2A}) |
| A_{2B}-selektiv | | | | | | |
| PSB-603 | 1,13 ^{b,M} | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| BAY60-6513 | 3-10 ^{a,M} | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | 37,5 ^{a,X} (A_{2B}) 80,2 ^{a,X} (A_{2B}) |

n.b. nicht bestimmt, a cAMP-Messung, b $[Ca^{2+}]_i$ -Messung, c hochaffine Bindungsstelle 61 nM (A_{2A})/niedrigaffine Bindungsstelle 1820 nM (A_{2B}), d Membranpräparation, e intakte Zellen, f hochaffine Bindungsstelle 700 nM/niedrigaffine Bindungsstelle 16100 nM, g hochaffine Bindungsstelle 20 nM (A_{2A})/niedrigaffine Bindungsstelle 1200 nM (A_{2B})

* **Jurkat T**: humane Leukämie T-Zelllinie, A_{2A} 0,5-4,6 pmol/mg A_{2B} 10-92 pmol/mg, **NIH 3T3**: murine Fibroblasten-Zelllinie, Rezeptordichte nicht quantitativ bestimmt, **HMC-1**: humane Mastzelllinie, A_{2A} 72 fmol/mg A_{2B} 128 fmol/mg, **PC12**: Ratten-Phäochromozytomazellen, A_{2A} 196 fmol/mg A_{2B} Rezeptordichte nicht quantitativ bestimmt, **Lymphozyten**: primäre humane Lymphozyten, A_{2A} 35 fmol/mg A_{2B} 54 fmol/mg

^AVan der Ploeg, I. et al. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1996**, 353, 250-260. ^BLinden, J. et al. *Mol. Pharmacol.* **1999**, 56, 705-713. ^CFeoktistov, I. et al. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 627-633. ^DVarani, K. et al. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 70, 1601-1612. ^EHide, I. et al. *Mol. Pharmacol.* **1992**, 41, 352-359. ^FVarani, K. et al. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 122, 386-392. ^GGessi, S. et al. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 2137-2147. ^HKull, B. et al. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 65-75. ^IUkena, D. et al. *Life Sci.* **1986**, 39, 743-750. ^JDaly, J.W. et al. *Pharmacology* **1991**, 42, 309-321. ^KNeustadt, B.R. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 17, 1376-1380. ^LBrackett, L.E. and Daly, J.W. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 801-814. ^MBertarelli, D.C.G. *Dissertation, Universität Bonn*, **2007**. ^NReith, U. *Dissertation, Universität Bonn*, **2001**. ^OBelardinelli, L. et al. *Circ. Res.* **1996**, 79, 1153-1160. ^POngini, E. et al. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1999**, 359, 7-10. ^QGessi, S. et al. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 134, 116-126. In dieser Studie wurde ein Jurkat T-Zellklon verwendet, der ein unterschiedliches AR-Expressionsmuster besitzt! ^RMirabet, M. et al. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 122, 1075-1082. ^SKaulich, M. *Dissertation, Universität Bonn*, **2003**. ^TFeoktistov, I. and Biaggioni, I. *J. Clin. Invest.* **1995**, 96, 1979-1986. ^UFredholm, B.B. et al. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 61, 443-448. ^VSchulte, G. and Fredholm, B.B. *Mol. Pharmacol.* **2000**, 58, 477-482. ^WYan, L. et al. *Expert Opin. Emerging Drugs* **2003**, 8, 537-576. ^XErgebnisse aus dem Arbeitskreis, teilweise unveröffentlicht.

Vergleicht man die in **Tabelle 2-10** und **2-11** dargestellten Daten für Jurkat T-Zellen mit den Werten der Verbindungen in anderen Zellsystemen, so zeigt sich, dass in den meisten Fällen die Werte an Jurkat T-Zellen um ein Vielfaches höher liegen als in den anderen Zellsystemen. Dadurch kann die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung eindeutig bestätigt werden, dass sowohl die Affinitäten als zusätzlich auch die funktionellen Aktivitäten der Verbindungen an A₂AR in Jurkat T-Zellen im Vergleich zu anderen Zellsystemen deutlich verringert sind.

Auch die von Daniela Bertarelli mittels einer Sättigung erhaltenen K_D-Werte für die Radioliganden zeigen niedrigere Affinitäten zu A₂-Adenosinrezeptoren auf Jurkat T-Zellen (siehe **Tab. 2-8**) im Vergleich zu den Rezeptoren in anderen (humanen, rekombinanten) Testsystemen.¹⁶⁶ So wurden für [³H]CCPA ein K_D von 2.6 ± 2.6 nM (Literaturwert: 0.61 ± 0.03 nM, Faktor 4.3),¹⁸⁷ für [³H]MSX-2 ein K_D von 36 ± 18 nM (Literaturwert: 7.3 ± 1.1 nM, Faktor 5.0),¹⁷⁷ für [³H]ZM241385 ein K_D von 327 ± 118 nM (Literaturwert: 0.23 ± 0.03 nM, Faktor 1422)¹⁸⁸ für [³H]PSB-298 ein K_D von 495 ± 78 nM (Literaturwert: 60 ± 1 nM, Faktor 8.3)¹⁸⁹ sowie für [³H]PSB-11 ein K_D von 3.7 ± 2.4 nM (Literaturwert: 4.9 ± 0.2 nM, Faktor 0.8)¹⁹⁰ bestimmt.¹⁶⁶ Auffallend ist hierbei, dass sich die verminderten Affinitäten verstärkt auf Liganden der beiden A₂-Adenosinrezeptorsubtypen auswirken, A₁- und A₃-Adenosinrezeptoren scheinen nicht betroffen zu sein. Ein Ansatzpunkt zur Erklärung dieser Sachlage könnte bei den Radioliganden zu finden sein. Verminderte Affinitäten von Radioliganden sind die Folge, wenn die radioaktiv markierten Substanzen durch Komponenten der während des Versuches eingesetzten Bestandteile wie z.B. Puffer oder Membranpräparationen/Zellen komplexiert bzw. ausgefällt werden. Die verminderte Affinität resultiert dann aus der Tatsache, dass die tatsächliche, freie Konzentration des Radioliganden sehr viel geringer ist als die für die weiteren Berechnungen eingesetzte, theoretische Konzentration. Da jedoch die verminderte Affinität bisher ausschließlich für Jurkat T-Zellen gezeigt werden konnte, bei denen eine Standardmethode zur Membranpräparation und im Assay der weit verbreitete Puffer Tris-HCl, 50 mM, pH 7.4 eingesetzt wurde, und die Radioliganden [³H]MSX-2 bzw. [³H]PSB-603 an allen anderen untersuchten Geweben dieses Phänomen nicht zeigen, ist diese Erklärung äußerst unwahrscheinlich. Außerdem ist zu bedenken, dass die verminderte Affinität unabhängig von strukturell unterschiedlichen Radioliganden durchgängig und ausschließlich für A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren gezeigt wurde. Die Erklärung dürfte also höchstwahrscheinlich auf Rezeptorebene zu

finden sein. Daniela Bertarelli diskutierte die Ergebnisse damit, dass der Aktivitätszustand der Rezeptoren einen Einfluss auf die Affinität der eingesetzten Radioliganden haben könnte.¹⁶⁶ In einer äußerlich einheitlichen Rezeptorpopulation liegt immer ein bestimmter Teil der Rezeptoren in einer aktivierten Konformation (high affinity state, R*) neben Rezeptoren in nicht-aktiviertem Zustand (low affinity state, R) vor, unabhängig von einer Ligandenbindung.^a

Die Fähigkeit eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors in Abwesenheit eines Agonisten in die aktive Konformation überzugehen, bezeichnet man als konstitutive Aktivität. Agonisten binden an den aktiven Zustand und stabilisieren diesen und verschieben dadurch das Gleichgewicht zugunsten der aktivierten Konformation R*. Neutrale Antagonisten binden an beide Rezeptorzustände gleichermaßen und haben keinen Einfluss auf die Gleichgewichtseinstellung. Bestimmte Antagonisten können den natürlichen biologischen Effekt, der durch die aktivierten, nicht Agonist-besetzten Rezeptoren ausgelöst wird, inhibieren, ein Phänomen, das als inverser Agonismus bezeichnet wird. Man stellt sich vor, dass inverse Agonisten bevorzugt an die nicht aktivierte Konformation R des Rezeptors binden, damit verschieben sie das Gleichgewicht zugunsten der nicht aktivierten Konformation und bewirken eine negative intrinsische Aktivität.¹⁷⁹ So scheint es denkbar, dass der Aktivitätszustand der in den Jurkat T-Zellen vorliegenden A₂-Adenosinrezeptoren einen Einfluss auf die Affinität der verwendeten Radioliganden hat. Allerdings zeigen nach den dargestellten Untersuchungen sowohl Agonisten als auch Antagonisten eine verringerte Affinität zu den Rezeptoren in Jurkat T-Zellen. So scheint es wahrscheinlicher, dass die Verringerung der Affinitäten der beiden A₂-Adenosinrezeptorsubtypen in engem Zusammenhang stehen und sich die Rezeptoren in irgendeiner Weise gegenseitig beeinflussen. Dies wäre z.B. durch das Vorhandensein von Heterodimeren bzw. Oligomeren zwischen A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren erklärbar. Eine weitere Möglichkeit wäre das Mitwirken eines zusätzlichen Proteins, das auf die Rezeptorkonformationen einwirkt und die Rezeptoren allosterisch beeinflussen kann. Auch die Kopplung an unterschiedliche G-Proteine bzw. Signaltransduktionswege

^a Man geht heute davon aus, dass nicht nur jeweils „eine“, sondern mehrere aktive sowie inaktive Rezeptorkonformationen existieren können.

wäre eine Möglichkeit, so konnte für A₂-Rezeptoren in Jurkat T-Zellen eine Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration gezeigt werden. Versuche an primären humanen T-Lymphozyten konnten dies für diesen Zelltyp nicht bestätigen⁶⁴ (siehe auch **Kap. 3**). Auch eine Verknüpfung dieser Möglichkeiten und damit das Vorhandensein einer komplexeren Situation ist durchaus denkbar.

2.4 Rezeptoroligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Lange Zeit war für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nur ein monomeres Modell akzeptiert, bei dem eine relative Stöchiometrie von Rezeptor zu G-Protein von 1:1 angenommen wurde. Erst seit Mitte der 1990er Jahre konnten zahlreiche Untersuchungen die Oligomerisierung verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zeigen,¹⁹¹ während eine Oligomerisierung anderer Rezeptorklassen wie zum Beispiel von Tyrosinkinase-Rezeptoren, bei denen eine konstitutive oder Liganden-induzierte Oligomerisierung essentiell für die Signalweiterleitung ist,¹⁹² schon viel früher bekannt war. Heute ist es weitgehend akzeptiert, dass die Rezeptor-Oligomerisierung ein allgemeiner Aspekt der GPCR-Biologie darstellt. Dabei kann eine Oligomerisierung zwischen gleichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auftreten (Homooligomere), aber auch zwischen Mitgliedern derselben Rezeptorfamilie oder zwischen Rezeptoren unterschiedlicher Familien (Heterooligomere).

Rezeptorhomo- bzw. -heterodimere wurden zuerst über (Ko-)Immunpräzipitation nachgewiesen. Dabei müssen die Rezeptoren mit verschiedenen Epitopen, sogenannten Tags, versehen werden (z.B. mit *HA* (Haemagglutinin) oder *myc* (Myelocytomatosis)) und können dann über Antikörper gegen die entsprechenden Epitope ausgefällt und über Messung der Adsorption, Western blotting oder einer folgenden Fluoreszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Ein bedeutender Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass die membrangebundenen Rezeptoren mittels Detergenzien solubilisiert werden müssen und sehr hydrophobe Proteine – wie es die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind – dazu neigen, bei einer nicht vollständigen Solubilisierung Aggregate zu bilden, die dann als Artefakte fälschlicherweise als Di- oder Oligomere gemessen werden.¹⁹³ Eine wesentlich elegantere und verlässlichere Methode ist deshalb der sogenannte Resonanz-Energietransfer, der über Fluoreszenz (FRET) oder über Biolumineszenz (BRET) übertragen werden kann. FRET/BRET-Studien basieren auf dem Transfer von Energie zwischen den elektromagnetischen Dipolen eines Energiedonors und eines Akzeptors. Im Falle von FRET sind Donor und Akzeptor Fluoreszenzmoleküle (z.B. GFP - *green fluorescent protein*, CFP - *cyan fluorescent protein* oder YFP - *yellow fluorescent protein*), die über Fusionsproteine meist mit dem Carboxy-Terminus der Rezeptoren verbun-

den werden, während bei BRET der Fluoreszenz-Donor durch die biolumineszierende katalytische Aktivität eines Enzyms ersetzt ist (z.B. Rluc - *Renilla luciferase*). Überlappen nun das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors und befinden sich Donor und Akzeptor in geringer räumlicher Entfernung (typischerweise $<100 \text{ \AA}$), findet bei einer Anregung des Donors ein Energieübergang auf den Akzeptor statt und auch der Akzeptorfluorophor wird angeregt und es kann eine Fluoreszenzemission detektiert werden.¹⁹³ Ist die räumliche Nähe nicht gegeben, so findet kein Energieübergang statt und das Akzeptormolekül zeigt keinerlei Fluoreszenz. Mittels der genannten Methoden konnten Homooligomere z.B. für A_1 - und A_{2A} -Adenosinrezeptoren, β_2 -Adrenorezeptoren, D_1 - und D_2 -Dopaminrezeptoren, H_2 - und H_4 -Histaminrezeptoren, M_2 - und M_3 -muskarinische Acetylcholinrezeptoren, 5-HT_{1B} und 5-HT_{1D} Serotoninrezeptoren, $mGlu_1$ - und $mGlu_5$ -Glutamatrezeptoren u.v.a. gezeigt werden.^{79,191,194}

Die Idee der Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen revolutionierte nicht nur das traditionelle Modell für Struktur und Funktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Bald nach der Entdeckung der ersten GPCR-Homooligomere wurde gezeigt, dass manche Rezeptoren Heterooligomere bilden und dass diese Heterooligomere funktionelle Charakteristiken aufweisen, die sich von den entsprechenden homogenen Populationen unterscheiden können.^{79,191} Man darf das resultierende Signal also nicht einfach als Summe der Signale der einzelnen beteiligten monomeren Rezeptoren betrachten.¹⁹⁵ Heterodimere, an denen Adenosinrezeptoren beteiligt sind, wurden so z.B. für A_1AR - $A_{2A}AR$, A_1AR - D_1 , $A_{2A}AR$ - D_2 , A_1AR - $P2Y_1$, A_1AR - $P2Y_2$, A_1AR - $mGlu_1$, $A_{2A}AR$ - $mGlu_5$ ⁷⁹ und $A_{2A}AR$ - CB_1 ⁸⁰ gefunden. Neueste Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein eines $A_{2B}AR$ - D_2 Rezeptorheteromers hin,¹⁹⁶ weitere dürften existieren. Die Frage, ob es sich bei den Komplexen um Dimere oder zumindest teilweise um Oligomere höherer Ordnung handelt, konnte noch nicht endgültig geklärt werden.¹⁹¹ Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird deshalb von Dimeren gesprochen - mit dem Wissen, dass es sich aber auch um potentielle Oligomere handeln könnte. In einer Zelle können Homodimere und verschiedenste Heterodimere gleichzeitig exprimiert werden,¹⁹⁵ so wurde z.B. eine Koexistenz von $A_{2A}AR$ -Monomeren mit A_{2A} - D_2 -Rezeptorheteromeren gezeigt.¹⁹⁴ Dies warf jedoch die Frage auf, ob Rezeptor-Dimere als konstitutiv vorhandene, stabil vorgeformte Komplexe vorliegen, oder ob es sich um dynamische Strukturen handelt, die durch eine Ligandenbindung moduliert werden bzw. dadurch erst gebildet werden.

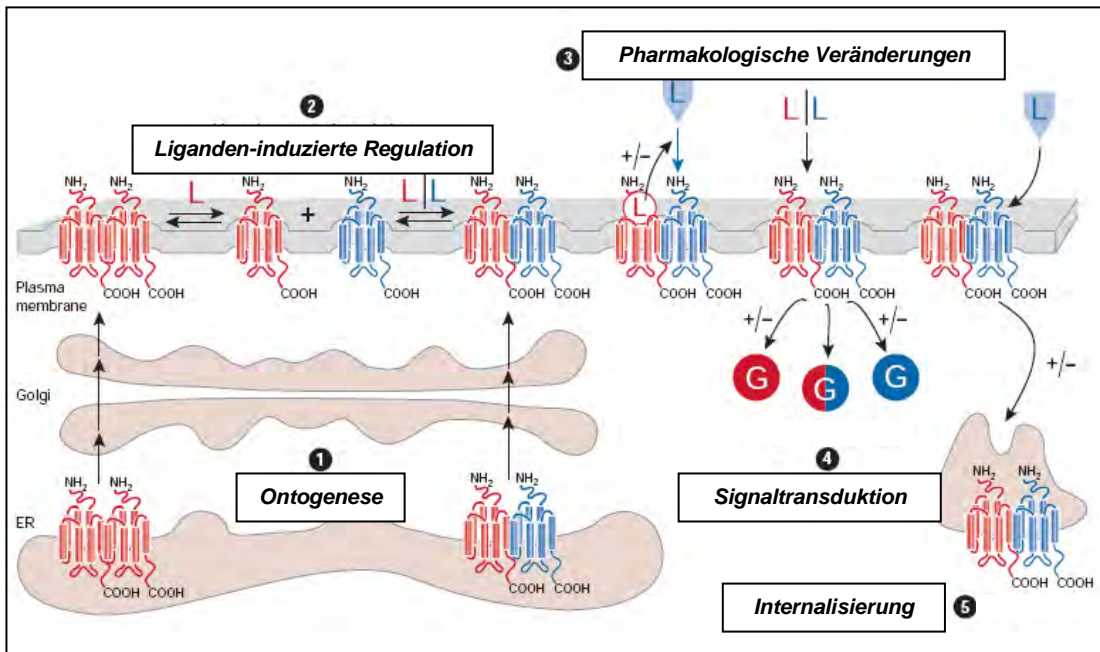


Abb. 2-24: Potentielle Rolle und Aufgaben der Dimerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. (1) In vielen Fällen ist eine Dimerisierung für die Rezeptor-Ontogenese, d.h. den korrekten Transport der Rezeptoren aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) an die Zelloberfläche essentiell, (2) Dimere werden teilweise über eine Ligandenbindung dynamisch reguliert, (3) eine Dimerisierung kann zu positiven und negativen Kooperativitäten bei der Ligandenbindung führen, (4) auch Signalkaskaden und G-Protein-Selektivitäten können verändert sein, und (5) eine Heteromerisierung kann eine Ko-Internalisierung von zwei Rezeptoren nach Stimulierung nur eines der beiden Rezeptoren bewirken. G: G-Protein, L: Ligand; nach¹⁹⁷

Es zeigte sich, dass ein Großteil der Rezeptorhomodimere bzw. -heterodimere konstitutiv vorgeformt vorliegt, so z.B. auch die A₁-Adenosin-D₁-Dopaminrezeptor- und A_{2A}-Adenosin-D₂-Dopaminrezeptor-Heterodimere,⁵⁴ es konnten jedoch auch Beispiele für eine Liganden-induzierte Bildung eines Dimers gezeigt werden, so z.B. für mehrere Chemokinrezeptoren,¹⁹³ siehe auch **Abb. 2-24** (2). Die Tatsache, dass offensichtlich viele Dimere recht schnell nach der Biosynthese konstitutiv gebildet werden, legte die Vermutung nahe, dass die Dimerisierung eine Rolle bei der Rezeptor-Ontogenese spielt. Die ersten Rezeptoren, für die dies nachgewiesen werden konnte, waren GABA_B-Rezeptoren. Es wurde gezeigt, dass eine Rezeptordimerisierung zwischen den Subtypen GABA_{B1} und GABA_{B2} essentiell für den Transport der Rezeptoren aus dem endoplasmatischen Retikulum durch das Zytoplasma zur Zellmembran und auch für die Rezeptorfunktionalität ist. Die jeweils monomeren Rezeptorsubtypen wurden entweder schon im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten oder waren auf der Zellmembran exprimiert, jedoch nicht funktionsfähig.¹⁹³ Daraufhin konnte in mehreren weiteren Studien mit verschiedenen GPCR-Homo- und Heterodimeren eine frühe Dimerisierung im endoplasmatischen Retikulum und deren Rolle für den Transport an die Zelloberfläche

und die Rezeptorfunktionalität nachgewiesen werden.¹⁹³ Heute gilt es als bewiesen, dass die Rezeptordimerisierung eine wichtige Rolle im „Qualitätskontrollsystem“ des endoplasmatischen Retikulums spielen kann, wobei falsch gefaltete Rezeptoren oder Rezeptoren mit Mutationen zurückgehalten werden und nur fertige, strukturell einwandfreie Rezeptordimere die Zellmembran erreichen und eingebaut werden, siehe auch **Abb. 2-24** (1). Diese Rolle der Dimerisierung im endoplasmatischen Retikulum schließt weitere Rollen einer Rezeptordimerisierung wie z.B. die funktionelle Beeinflussung einer Ligandenbindung über positive oder negative Kooperativität jedoch nicht aus. Bereits im Jahre 1999 zeigten Jordan und Devi erstmals für Opioidrezeptoren, dass eine Heterodimerisierung zwischen verschiedenen Rezeptorsubtypen zu veränderten pharmakologischen Eigenschaften im Vergleich zu den jeweiligen Eigenschaften der monomeren Rezeptoren führt.¹⁹⁸ Eine Koexpression von δ - und κ -Opioidrezeptoren in derselben Zelle führte dabei zu einem vollständigen Affinitätsverlust von selektiven δ - und κ -Liganden, sowohl von Agonisten als auch von Antagonisten. Auch für A_1 - A_{2A} -Adenosinrezeptordimere,¹⁹⁵ A_1 -Adenosin- D_1 -Dopaminrezeptordimere, A_{2A} -Adenosin- D_2 -Dopaminrezeptordimere und A_1 -Adenosin-mGlu $_{1\alpha}$ -Glutamatrezeptordimere konnte eine veränderte Pharmakologie beobachtet werden.¹⁹¹ Das striatale A_1 - A_{2A} -Adenosinrezeptordimer bildet dabei einen so genannten konzentrationsabhängigen „Schalter-Mechanismus“, über den niedrige und hohe synaptische Adenosinkonzentrationen genau entgegengesetzte Effekte auf die Glutamat-Ausschüttung ausüben,¹⁹⁹ siehe auch **Abb. 2-24** (3). Ebenfalls ist eine Beeinflussung der Interaktion mit G-Proteinen und der daraus resultierenden veränderten Signaltransduktion denkbar,¹⁹³ es ändern sich dabei die Selektivitäten mancher G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu den verschiedenen G-Protein-Subfamilien wie G_s , G_i , G_q u.a.¹⁹⁷ Es wurde z.B. gezeigt, dass der $P2$ -Rezeptorligand ADP β S die Bindung des Adenosinrezeptoragonisten **NECA** an ein A_1 - $P2Y_1$ -Rezeptorheterodimer inhibiert.²⁰⁰ Dieser pharmakologische Effekt wird begleitet von Signalkaskaden, die sich von denen der Rezeptoren, die als Monomere in einer Zelle exprimiert werden, unterscheiden. ADP β S hat keinerlei Effekt auf die Adenylatcyclase in Zellen, die entweder nur A_1 -Adenosinrezeptoren oder nur $P2Y_1$ -Rezeptoren exprimieren, in Zellen die jedoch das A_1 - $P2Y_1$ -Rezeptorheterodimer exprimieren, bewirkte ADP β S eine Inhibierung der cAMP-Akkumulierung. Dieser Effekt konnte durch den A_1 AR-Antagonisten **DPCPX** blockiert werden, was darauf hindeutet, dass das Signal tatsächlich über das Heterodimer vermittelt wird,^{79,201} siehe auch **Abb. 2-24** (4). Rezeptorhomo- bzw. heterodimerisierung führt also zu einer so genannten intramembra-

nären Interaktion, was bedeutet, dass sich die Pharmakologie für Agonisten und/oder Antagonisten eines bestimmten Rezeptors ändert, wenn der Rezeptor Heteromere mit einem anderen Rezeptor bildet und/oder wenn der Partnerrezeptor innerhalb eines Heteromers aktiviert wird.¹⁹⁵ Dies geschieht aufgrund von Konformationsänderungen der Rezeptoren an der Rezeptor-Rezeptor-Kontaktstelle, dabei können sowohl positive als auch negative Kooperativitäten auftreten (siehe **Abb. 2-25**).

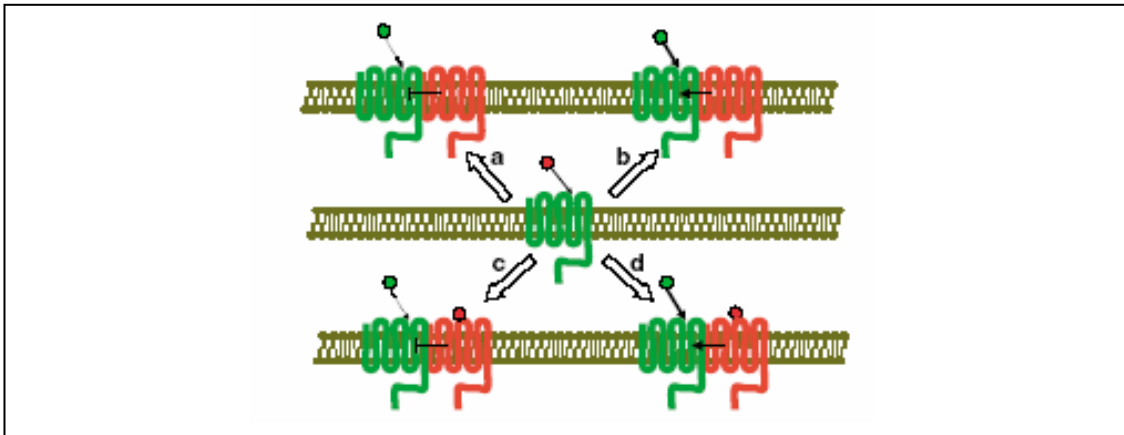


Abb. 2-25: Pharmakologische Änderungen als Folge einer Heteromerisierung. Die Affinität des grünen Liganden hin zu dem grünen Rezeptor kann sowohl in positiver (**b,d**) als auch in negativer (**a,c**) Weise beeinflusst werden; entweder durch reine Dimerisierung mit dem (roten) Partnerrezeptor (**a,b**) oder durch die zusätzliche Besetzung der orthosteren Bindungsstelle des roten Rezeptors mit dem roten Liganden (**c,d**); nach¹⁹⁵

Die meisten Studien zeigen übereinstimmend, dass Rezeptorhomo- und heterodimerisierungen über nicht-kovalente Interaktionen zweier G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zustande kommen. Dafür wurden zwei Modelle entwickelt: in einem sogenannten „Kontaktdimer-Modell“ sollen die beiden Rezeptoren des Dimers dicht gepackt nebeneinander liegen und der Kontakt nur lateral stattfinden, die Rezeptorstrukturen würden dabei erhalten bleiben und jeder Rezeptor besteht weiterhin aus „seinen“ sieben Transmembrandomänen mit der dadurch gebildeten Bindungstasche. Ein zweites Modell, das sogenannte „Domain-swapped-Modell“ besagt, dass sich die beiden Rezeptoren neu formieren und die Transmembrandomänen eines Rezeptor nicht mehr eine Bindungstasche bilden, sondern erst die Zusammenlagerung mit den Transmembrandomänen des anderen Rezeptors die Bindungstaschen gebildet werden, es entsteht sozusagen ein Chimär aus beiden beteiligten Rezeptoren.³⁶ Funktionelle Studien mit mutierten Rezeptoren weisen allerdings darauf hin, dass die Oligomerisierung in den meisten Fällen wohl eher nach dem „Kontaktdimer-Modell“ stattfindet.³⁶ Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Domänen an der Oligomerisierung von G-Protein-gekoppelten Re-

zeptoren beteiligt sein können und dass es höchstwahrscheinlich keinen allgemein gültigen Mechanismus zur Dimerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren gibt,¹⁹¹ ein Feld, was jedoch auf jeden Fall noch weiterer Untersuchungen bedarf. Dimere werden aber in den meisten Fällen über Disulfidbrücken und van-der-Waals-Interaktionen zwischen den beteiligten Kontaktdomänen stabilisiert.^{36,191} Transmembranhelix 4 wird eine wesentliche Rolle bei der Homooligomerisierung zugesprochen,³⁶ bei A_{2A}-D₂-Rezeptordimeren scheint z.B. die fünfte transmembranäre Domäne und/oder der dritte intrazelluläre Loop des D₂-Rezeptors mit dem Carboxy-Terminus sowie der vierten transmembranären Domäne des A_{2A}AR zu interagieren.²⁰² Eine durch einen Agonisten vermittelte Aktivierung des A_{2A}AR bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die wiederum auf den D₂-Rezeptor übertragen wird, in diesem Fall im Bereich der Bindungstasche für D₂-Rezeptorliganden, was wiederum zu einer verminderten Affinität des D₂-Rezeptors für seine Liganden führt.²⁰²

Nicht nur die Ligandenbindung eines Dimers zeigt veränderte Eigenschaften im Vergleich zu den monomeren Rezeptoren, auch die Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung scheint durch die Bildung von Dimeren beeinflusst zu werden. Auch hier kann das in **Abb. 2-25** dargestellte Modell angewandt werden, sodass die Rezeptordesensibilisierung entweder verstärkt oder abgeschwächt wird und evtl. erst über eine Besetzung der orthosteren Bindungsstelle in Dimeren auftreten kann.¹⁹⁵ Auch wird berichtet, dass für einige Rezeptorheterodimere die Stimulierung eines Rezeptorpartners die Internalisierung des Dimers, also beider Rezeptoren, zur Folge hat (siehe auch **Abb. 2-24** (5)). Dies konnte unter anderem auch für A_{2A}-D₂-Rezeptordimere gezeigt werden.¹⁹⁷

Die Entdeckung, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Dimere bzw. Oligomere bilden können, vervielfacht also die Möglichkeiten der Rezeptorfunktionen und die Diversität der Signalkaskaden drastisch. Das Auftreten von Rezeptorheteromeren mit veränderten pharmakologischen Eigenschaften und veränderten Signalkaskaden erschließt ein komplett neues Gebiet bei der Suche nach neuen Targets für potentielle Wirkstoffe. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Beeinflussung von Adenosinrezeptoren bei der Parkinson'schen Krankheit, bei der das Hauptziel eigentlich Dopaminrezeptoren z.B. durch Gabe des Dopaminvorläufers **L-DOPA** (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) darstellen. Die Heterodimerisierung von A_{2A}-Adenosinrezeptoren mit D₂-Dopaminrezeptoren besitzt

einen antagonistischen Charakter, es wird also die Affinität des einen Rezeptorpartners (Dopaminrezeptoren) durch die Aktivierung des anderen Rezeptors (A_{2A} -Adenosinrezeptor) deutlich vermindert, man kann also sagen, dass der sehr sensitive D_2 -Rezeptor unter streng antagonistischer Kontrolle durch den A_{2A} -Adenosinrezeptor steht. Eine solche Heterodimerisierung konnte im Striatum nachgewiesen werden.¹⁹⁵ Auf dieser Grundlage sind zur Zeit mehrere A_{2A} -Adenosinrezeptorantagonisten in der klinischen Testung als Therapeutika gegen die neurodegenerative Krankheit, z.B. **SCH-420814** (Preladenant), wobei an dieser Stelle erwähnt werden muss, dass A_{2A} -Rezeptor-Antagonisten auch schon bei alleiniger Gabe Wirksamkeit gegen die Parkinson'sche Krankheit besitzen, unabhängig von der D_2 -Rezeptor-modulierenden Eigenschaft.^{182,202}

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete, stark veränderte Pharmakologie, die sich durch eine signifikante Verringerung der Affinitäten von A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptorliganden zu den jeweiligen Rezeptoren in Jurkat T-Zellen zeigt, im Rahmen dessen, was bislang über Heteromerisierungen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bekannt ist, auf eine Dimerisierung von A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren in humanen T-Lymphozyten hindeuten könnte, denn auffälligerweise zeigen in dieser Zelllinie beide A_2 -Adenosinrezeptorsubtypen gleichzeitig eine stark veränderte Pharmakologie. Diese These wird von neuesten Ergebnissen des Arbeitskreises um Sitkovsky unterstützt, der unlängst ebenfalls eine Heterodimerisierung von A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren in (primären) humanen Lymphozyten postulierte. Er vertritt dabei die These, dass der A_{2A} -Adenosinrezeptor mit seinem vergleichsweise sehr langen, intrazellulären Carboxy-Terminus für einen erfolgreichen Transport des A_{2B} -Adenosinrezeptors an die Zelloberfläche und dessen Einbau in die Zellmembran essentiell zu sein scheint, sodass ohne A_{2A} -Adenosinrezeptoren auch keine Adenosinrezeptoren des A_{2B} -Subtyps auf der Zellmembran exprimiert würden und der A_{2A} AR für den A_{2B} AR eine Art Chaperon darstellt.²⁰³ Hinweise, dass diese These ebenfalls auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lymphozyten zutrifft, konnten nicht gefunden werden. In Jurkat T-Zellen werden signifikant mehr A_{2B} - als A_{2A} -Adenosinrezeptoren exprimiert, eine Tatsache, die laut These von Sitkovsky theoretisch überhaupt nicht möglich wäre. Es lässt sich aufgrund der gezeigten Ergebnisse viel eher postulieren, dass A_{2A} - A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen über Mechanismen wie z.B. eine Dimerisierung inhibiert werden und dadurch die Affinität zu den jeweiligen Liganden

für beide Rezeptoren stark verringert ist. Jedoch gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass dabei ein Rezeptor eine Hilfsfunktion für den anderen Rezeptor ausübt. Auf Jurkat T-Zellen spricht die erhöhte Expression von A_{2B}-Adenosinrezeptoren für eine wichtige Rolle des Rezeptorsubtyps auf diesen Zellen, es sind mit 75.5 ± 20.5 pmol/mg Protein ca. 16-mal mehr A_{2B}AR als A_{2A}AR mit 4.56 ± 3.65 pmol/mg Protein vorhanden. Geht man von einer A_{2A}-A_{2B}-Adenosinrezeptor-Heterodimerisierung aus, läge der Hauptteil der A_{2B}-Adenosinrezeptoren aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorexpressionen nicht als Heterodimer mit A_{2A}AR vor. Für A_{2B}AR-Liganden an Jurkat T-Zellmembranpräparationen wurden jedoch ebenfalls stark veränderte pharmakologische Eigenschaften gefunden. Läge der Großteil der A_{2B}-Rezeptoren als Monomere/Homodimere mit normalem, A_{2B}AR-typischem pharmakologischem Profil vor, so dürfte sich dieses Phänomen nicht zeigen. Theoretisch wäre es durchaus denkbar, dass die A_{2A}-A_{2B}-Heterodimere nicht im Verhältnis 1:1 gebildet werden, sondern dass es sich um Rezeptoroligomere mit einem A_{2B}- zu A_{2A}-Verhältnis höherer Ordnung, z.B. 2:1, handelt. Da es sich in dem hier vorliegenden Fall aufgrund der auf Proteinebene ermittelten B_{max}-Werte in Jurkat T-Zellen jedoch um ein Konstrukt von ca. sechzehn A_{2B}-Adenosinrezeptoren oligomerisiert mit einem einzigen A_{2A}-Adenosinrezeptor handeln müsste, die sich allesamt gegenseitig beeinflussen, erscheint diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich. Nicht unbeachtet soll an dieser Stelle jedoch die Tatsache gelassen werden, dass sich auf mRNA-Ebene eine nicht signifikant unterschiedliche mRNA-Expression für A_{2A}AR und A_{2B}AR in Jurkat T-Zellen zeigte (68 ± 1 % für A_{2A} versus 65 ± 8 % für A_{2B}, Klon I, siehe **Abb. 2-11**). Somit wäre es durchaus denkbar, dass aufgrund der stark verringerten Affinitäten der eingesetzten (Radio-)Liganden die ermittelten B_{max}-Werte nur sehr bedingt aussagekräftig sind und nach den Daten der Real-time-PCR eine A_{2A}-A_{2B}AR-Dimerisierung im Verhältnis 1:1 wiederum wahrscheinlich ist. Nichtsdestotrotz muss an dieser Stelle neben einer A_{2A}-A_{2B}-Adenosinrezeptor-Heterodimerisierung eine Beteiligung weiterer Komponenten in Jurkat T-Zellen in Betracht gezogen werden. So könnte es durchaus sein, dass die auf Proteinebene detektierten, „überzähligen“ A_{2B}AR Homodimere bilden oder mit anderen (G-Protein-gekoppelten) Rezeptoren Heterodimere bilden, es wurden Rezeptorexpressionen z.B. von mGlu₁- und mGlu₅-metabotropen Glutamatrezeptoren, des Chemokinrezeptors CXCR4 und des Cholecystokinin2-(CCK₂)-Rezeptors auf Jurkat T-Zellen nachgewiesen,²⁰⁴⁻²⁰⁶ weitere dürften exprimiert werden. Eine zusätzliche Möglichkeit wäre das Vorhandensein allosterisch modulierender Proteine wie Arrestine, G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen (GRKs) oder die

Kopplung an weitere Signaltransduktionswege, die die Ligandenbindung in irgendeiner Form zu beeinflussen vermögen. GRKs haben mehrere Funktionen: Sie können mit den G-Protein-Untereinheiten (α und $\beta\gamma$) interagieren, wodurch diese nicht mehr zur Signaltransduktion beitragen können. Außerdem können sie als GTPase-aktivierende Proteine (GAP) wirken und die Spaltung von GTP in GDP und Phosphat beschleunigen (siehe **Kap. 1.2.3**). Des Weiteren agieren GRKs als Serin-/Threoninkinasen und können G-Protein-gekoppelte Rezeptoren phosphorylieren. Folgen der Rezeptor-Phosphorylierung sind u.a. eine Konformationsänderung, die die Rezeptor-G-Protein-Interaktion bzw. die Affinität des Rezeptors beeinflussen kann, sowie eine Interaktion mit β -Arrestinen. Durch Bildung eines GPCR-Arrestin-Komplexes wird eine Anbindung der G-Proteine sterisch verhindert, ausserdem dienen die β -Arrestine als Verbindungsmoleküle für die Interaktion mit weiteren Molekülen/Enzymen wie z.B. Clathrin oder MAP-Kinasen. Clathrin spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Rezeptorinternalisierung. Die Bindung von MAP-Kinasen kann zu einem Wechsel des Signaltransduktionsmechanismus führen, was bedeutet, dass die MAP-Kinasen nicht mehr über G-Proteine, sondern direkt vom Rezeptor stimuliert werden können. Auch wurden mehrere akzessorische Proteine beschrieben, die mit dem Carboxy-Terminus des $A_{2A}AR$ interagieren.⁵⁹ Akzessorische Proteine sind Proteine, die keine G-Proteine, regulatorische Kinasen oder β -Arrestine sind und in Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden eingreifen bzw. die Rezeptordesensibilisierung beeinflussen können. Beispiele dieser Proteine, für die eine Interaktion mit dem $A_{2A}AR$ beschrieben wurde, sind α -Aktinin („bindet“ den $A_{2A}AR$ an das Aktin-Zytoskelett und spielt deshalb eine Rolle bei der schnellen Desensibilisierung der Rezeptoren),²⁰⁷ die Ubiquitin-spezifische Protease USP4 (ein Deubiquitinierungsenzym, das den Transport der Rezeptoren aus dem endoplasmatischen Retikulum forciert und deshalb eine Rolle bei der Membranexpression der Rezeptoren spielt),⁵⁶ der Nukleotid-Austauschfaktor für ARF6, ARNO (*ADP-ribosylation factor nucleotide site opener*, der die fortwährende, G-Protein-unabhängige Aktivierung von MAP-Kinasen über $A_{2A}AR$ vermittelt)⁵⁷ oder das Translin-assoziierte Protein-X (TRAX), für das eine Proliferationshemmung von PC12-Zellen über einen p53-unabhängigen Signalweg gezeigt wurde.⁵⁵ Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein DNA-bindendes Phosphoprotein, das den Zellzyklus reguliert. Sun *et al.* konnten damit zeigen, dass durch eine Stimulierung des $A_{2A}AR$ auf PC12-Zellen die Proliferations-hemmende Rolle von p53 umgangen/ersetzt werden kann - vorausgesetzt, TRAX wird exprimiert.⁵⁵

Interessant war es an dieser Stelle zu untersuchen, ob sich in den durchgeführten Radioligandbindungsstudien eine oder mehrere Bindungsstellen/Rezeptorkonformationen/Affinitätszustände für A_{2B} AR-Liganden in Jurkat T-Zellen finden lassen. Dadurch könnten erste Hinweise gewonnen werden, ob es sich um eine einheitliche Rezeptorpopulation handelt, oder ob der beobachtete Effekt ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren bei der Beeinflussung der Rezeptoraffinitäten darstellt. Dies geschah mittels einer Berechnung der Kompetitionskurven aus den homologen Kompetitionen (**Abb. 2-21**) durch ein Zwei-Bindungsstellenmodell. Für A_{2A} AR konnten dabei die beiden K_i -Werte K_{i1} : 179 ± 65 nM und K_{i2} : 177 ± 65 nM im Vergleich zu einem K_i -Wert von 287 ± 40 nM für das Ein-Bindungsstellenmodell bestimmt werden, was eindeutig für nur eine einzige (niedrig affine) A_{2A} -Bindungsstelle spricht. Dies wäre nach der Dimerisierungstheorie auch nicht weiter verwunderlich, da ja nahezu alle A_{2A} AR im Heterodimer mit A_{2B} AR vorliegen würden. Für den A_{2B} -Adenosinrezeptor ist eine Berechnung mittels des Zwei-Bindungsstellenmodells unglücklicherweise nicht möglich, da der verwendete Radioligand [3 H]PSB-603 eine sehr begrenzte Löslichkeit besitzt und im unteren Bereich der Kurve ab einer Konzentration von ca. 50 nM ausfällt. Es kann mittels Extrapolation zwar eine Kurve erstellt und daraus der K_i -Wert von 55.4 ± 0.6 nM für das Ein-Bindungsstellenmodell bestimmt werden, eine Bestimmung von zwei aussagekräftigen K_i -Werten mittels des Zwei-Bindungsstellenmodells ist aufgrund fehlender Datenpunkte jedoch leider nicht möglich (siehe **Abb. 2-22**). Da zurzeit kein weiterer Radioligand für den A_{2B} AR verfügbar ist, der bei ähnlich guter Affinität und Selektivität eine verbesserte Löslichkeit besitzt, konnte dieser Ansatz leider nicht weiterverfolgt werden.

In der Literatur finden sich einige Beispiele, bei denen - wie auch in Jurkat T-Zellen - sowohl A_{2A} - als auch A_{2B} -Adenosinrezeptoren koexprimiert werden, teilweise mit dem A_{2B} AR als dem dominant exprimierten Adenosinrezeptor. So fanden Huang *et al.* eine Koexpression beider Rezeptoren auch auf murinen T-Lymphozyten.¹²⁷ Eine Koexpression beider A_2 -Adenosinrezeptor-Subtypen wurde ebenfalls u.a. auf Ratten-PC12-Zellen, murinen sowie humanen Mastzellen, Gefäßendothelzellen, humanen Neutrophilen,⁶⁰ der Nagetier-Neuroblastoma x Glioma-Hybridzelllinie NG108-15²⁰⁸ sowie in verschiedenen Gehirnnarealen wie z.B. dem Cortex²⁰⁹ beschrieben. Eckle *et al.* und andere konnten die Expression beider A_2 -Adenosinrezeptorsubtypen auf Herzgewebe sowie auf Blutgefäßendothelzellen wie Koronararterien zeigen. Sie untersuchten dabei den Einfluss einer ischämischen Hypoxie auf die Adenosinrezeptorexpression und fanden

eine ca. 15-fache Hochregulation des A_{2B}AR zusammen mit CD73, dabei besitzen die A_{2B}AR eindeutig kardioprotektive Eigenschaften. Die A_{2A}AR-Expression wird dabei sogar noch herunterreguliert.²¹⁰⁻²¹² Auch im reno-vaskulären System zeigt eine Hochregulierung von A_{2B}AR protektive Effekte während einer ischämischen Hypoxie,²¹³ ebenso wurde für Zellen der bronchialen, glatten Muskulatur eine deutliche Erhöhung der Expressionsraten für den A_{2B}AR unter hypoxischen Bedingungen festgestellt.²¹⁴ Ebenfalls konnten in einigen Tumorzellen vermehrte A_{2B}AR-Expressionen gefunden werden, neben den im Rahmen dieser Arbeit schon ausführlich beschriebenen Jurkat T-Zellen konnte auch auf Mammakarzinomzellen,²¹⁵ Blasenkarzinomzellen²¹⁶ und weiteren²¹⁷ eine Hochregulierung der A_{2B}-Adenosinrezeptoren beobachtet werden, dabei wird dem A_{2B}AR eine Rolle bei der Tumorprogression zugeschrieben.²¹⁷ Allgemein auf Immunzellen wie Monozyten,²¹⁸ dendritischen Zellen,²¹⁸ Makrophagen,¹⁰⁵ Granulozyten,²¹⁹ und Mastzellen¹²¹ finden sich vergleichsweise hohe A_{2B}AR-Expressionsraten. Auch auf Bronchialzellen (Lungenfibroblasten,²²⁰ Zellen der glatten Muskulatur,²¹⁴ Epithelzellen^{141,221}) sowie auf Zellen des Gastro-Intestinal-Traktes¹⁴⁴ inklusive der Blase ist der A_{2B}AR stark exprimiert und besonders bei entzündlichen Erkrankungen dieser Organe wird die A_{2B}AR-Expression sogar noch verstärkt, sodass A_{2B}AR eine wichtige Rolle allgemein im Immunsystem bei Allergien und Entzündungserkrankungen zugeschrieben wird. Eine besondere Rolle scheinen sie bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und COPD^{139,220} zu spielen. Eine Aktivierung von A_{2B}AR auf Mastzellen fördert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-6, IL-8 und IL-13 und trägt damit entscheidend zur Pathogenese dieser Erkrankungen bei. Auch bei entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulerosa^{144,222} sowie der entzündlichen Blasenkrankung interstitiale Zystitis²¹⁶ scheinen A_{2B}AR von besonderer Bedeutung zu sein. Feoktistov *et al.* kamen bereits 2004 zu dem Schluss, dass in vielen Zellen A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren koexprimiert werden und dass dabei jedoch meist ein Subtyp funktionell stark dominiert. Sie vermuteten, dass unter pathophysiologischen Bedingungen, die von einer Hypoxie begleitet werden, wie zum Beispiel Entzündungs- oder Tumorerkrankungen, der A_{2B}AR – der normalerweise ruhig und nicht aktiv ist – zum prädominanten Adenosinrezeptorsubtyp hochreguliert wird und bei der Aktivierung von Kompensationsmechanismen beteiligt ist.²¹⁴

Hinweise auf A_{2B}-Rezeptoren mit einer veränderten Pharmakologie, wie sie für Jurkat T-Zellen gefunden wurde, konnten in anderen Zellsystemen bislang nicht eindeutig

beschrieben werden. Interessant wäre dies - zum weiteren Verständnis des Phänomens in Jurkat T-Zellen - vor allem für Zellsysteme, in denen A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren (endogen) koexprimiert werden. So zeigten sich bei einem Vergleich von Affinitätsdaten und funktionellen Werten verschiedener A_2 -Adenosinrezeptorliganden aus unterschiedlichen Zellsystemen (siehe **Tab. 2-10** und **2-11**), dass keine eindeutige Abhängigkeit zwischen Pharmakologie und Verhältnis der exprimierten A_2 -Adenosinrezeptoren besteht. Brackett und Daly untersuchten bereits 1994 den A_{2B} AR in murinen NIH 3T3-Fibroblasten, einem Zellsystem, auf dem der A_{2B} -Adenosinrezeptor – wie auf Jurkat T-Zellen – dominant exprimiert wird. Eine Rezeptorexpression von A_{2A} AR konnte auf diesen Zellen bis dato nicht eindeutig nachgewiesen werden. Sie fanden dabei A_{2B} -Adenosinrezeptoren, die – mit kleineren Ausnahmen – A_{2B} AR-typische pharmakologische Eigenschaften zeigten.²²³ Eine interessante Tatsache war dabei die Beobachtung, dass sich die in funktionellen Studien (cAMP-Messungen) an intakten Zellen ermittelten Werte stark von den an Membranpräparationen gefundenen Werten unterscheiden, dabei waren die untersuchten Verbindungen an intakten Zellen um ein Mehrfaches potenter als an Membranpräparationen. Hinreichend geklärt werden konnte dieses Phänomen bis heute nicht.²²³ Auch alle anderen in **Tab. 2-10** und **2-11** dargestellten Zellsysteme zeigten Abweichungen, die durch die verwendeten, unterschiedlichen Radioliganden und die üblichen biologischen Schwankungen erklärt werden könnten und nicht zwingend auf eine veränderte Rezeptorphanakologie schliessen lassen. Es existieren jedoch nur relativ wenige, ausführliche Studien zur Untersuchung der Affinität und funktionellen Charakteristiken von nativ in Zellsystemen koexprimierten A_2 -Adenosinrezeptoren. Viele der durchgeführten Testungen werden heutzutage, aufgrund der höheren Rezeptorexpression und zur Vermeidung von evtl. Interaktionen mit Effekten an anderen Adenosinrezeptorsubtypen, vor allem für den niedrigaffinen A_{2B} AR, an rekombinant exprimierten Rezeptoren durchgeführt, sodass sich aus den Literaturdaten keine abschliessende Aussage treffen lässt. So wäre es hochinteressant, einen breiteren Vergleich pharmakologischer Daten an A_2 -Adenosinrezeptoren in Zelllinien zu haben, die A_{2A} - und A_{2B} AR koexprimieren, mit dem A_{2B} AR als dem dominant exprimierten Subtyp. Neben Jurkat T-Zellen wurde als Zelllinie mit diesem Expressionsmuster bislang nur die humane Mastzelllinie HMC-1 näher untersucht, in der die A_{2B} -Adenosinrezeptoren jedoch scheinbar ein A_{2B} AR-typisches Profil besitzen (siehe **Tab. 2-10** und **2-11**).^{61,62,224,225} Auch in den untersuchten Zellsystemen, in denen A_{2A} AR und A_{2B} AR etwa zu gleichen Anteilen bzw. der A_{2A} AR dominant exprimiert werden,

zeigen sich keine pharmakologischen Veränderungen. Um die im Rahmen dieser Arbeit erstmals postulierte Hypothese, dass der in Jurkat T-Zellen in einem A_{2B} - A_{2A} AR-Heteromer (dominant) exprimierte A_{2B} AR gehemmt vorliegt und zusätzlich den Dimerisierungspartner ebenfalls stark inhibiert, zu untermauern, wäre es von großer Bedeutung, weitere Zellsysteme zu identifizieren, in denen dieses Phänomen ebenfalls zu beobachten ist.

Hinweise für eine Heterodimerisierung von A_{2A} - mit A_{2B} -Adenosinrezeptoren auf primären humanen T-Lymphozyten konnten im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Studien nicht gefunden werden. Eine eventuelle Heterodimerisierung scheint sich jedenfalls für diesen Zelltyp nicht in einem veränderten pharmakologischen Profil mit niedrigeren Affinitäten der Liganden zu den Rezeptoren zu manifestieren. Für unstimulierte primäre humane T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren in gleichem Ausmaß exprimiert werden (3581 ± 2280 Bindungsstellen/Zelle für A_{2A} AR im Vergleich zu 3240 ± 815 Bindungsstellen/Zelle für A_{2B} AR) und dass sich die Zahl der A_{2A} AR infolge einer Stimulierung der Zellen um etwa das 3-fache erhöht, während die Zahl der A_{2B} AR relativ konstant bleibt. Dies könnte auf die beschriebene, wichtige Rolle von A_{2A} AR als „Stoppsignal“ einer Immunreaktion hinweisen. Durch die Stimulierung der Zellen wird der A_{2A} AR hochreguliert, dadurch steht auf einmal eine sehr viel größere Zahl an A_{2A} AR zur Verfügung und der EC_{50} -Wert für Adenosin wird gesenkt. Die Rezeptoren werden im Zuge der T-Lymphozytenstimulierung über die Hochregulierung der Rezeptorzahl sozusagen aktiviert und ihr Signal intensiviert.

2.5 Vergleich: Real-time-PCR und Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Fasst man die in **Kapitel 2.2** und **2.3** dargestellten Ergebnisse für die Rezeptorexpression zusammen, die mittels Real-time-PCR auf Transkriptionsebene und mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien auf Proteinebene für die Expression von Adenosinrezeptor-mRNA bzw. -protein für die einzelnen Subtypen gewonnen werden konnten, so zeigt sich das in **Tab. 2-12** dargestellte Bild.

Tab. 2-12: Zusammenfassung der Expressionsprofile der Adenosinrezeptor-Transkripte und -Proteine in verschiedenen humanen T-Lymphozyten (-- keine Expression bis +++ sehr starke Expression detektierbar).

| | | mRNA | Protein |
|--|-----------------|------|---------|
| Primäre unstimulierte T-Lymphozyten | A ₁ | + | +- |
| | A _{2A} | +++ | +- |
| | A _{2B} | + | ++ |
| | A ₃ | ++ | -- |
| Primäre stimulierte T-Lymphozyten | A ₁ | + | -- |
| | A _{2A} | +++ | +++ |
| | A _{2B} | + | + |
| | A ₃ | ++ | +- |
| Jurkat T | A ₁ | ++ | -- |
| | A _{2A} | ++ | +++ |
| | A _{2B} | ++ | +++ |
| | A ₃ | + | -- |

Dabei fällt ins Auge, dass die Ergebnisse für die beiden A₂-Adenosinrezeptorsubtypen auf Transkriptionsebene in den meisten Fällen sehr gut mit den Ergebnissen der A₂-Adenosinrezeptorexpression auf Proteinebene übereinstimmen, die Expressionsmuster sind nahezu identisch. Ein völlig anderes Bild zeigt sich jedoch für den Vergleich der in der Tabelle rot hinterlegten Expressionsmuster für A₁- und A₃-Adenosinrezeptorsubtypen. Es konnte in allen untersuchten Lymphozyten mRNA für A₁- und A₃-

Adenosinrezeptoren detektiert werden, auf Proteinebene konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden, es zeigt sich keine signifikant detektierbare Proteinexpression für die beiden Subtypen. Dies kann mehrere Gründe haben. Das Proteom einer Zelle wird größtenteils, aber nicht ausschließlich durch Genexpression reguliert, dabei stehen Transkriptom und Proteom auf hoch komplexe und kontrollierte Weise in Wechselwirkung.¹⁷⁵ Im Gegensatz zum sehr statischen Genom beschreiben Transkriptom und Proteom dynamische Zustände, die den Differenzierungszustand einer Zelle wiedergeben, die jeweilige Zusammensetzung ändert sich im Laufe eines Zellzyklus bzw. des Lebenszyklus einer Zelle. Bislang ist wenig über die Korrelation von Transkriptom und Proteom bekannt, so konnten bisher nur einige Signaltransduktionswege und metabolische Kaskaden identifiziert werden.¹⁷⁵ Quantitative Änderungen der mRNA-Transkripte stimmen zwar größtenteils, jedoch sicher nicht ausnahmslos immer mit der Proteinbildung überein, sodass Analysen auf mRNA-Ebene nur unvollständig Auskunft über zelluläre Prozesse geben können.²²⁶ Aus einer einzigen prä-mRNA können durch posttranskriptionelles Anhängen von z.B. der 5'-Kappe oder des PolyA-Schwanzes an das 3'-Ende oder durch Spleißen mehrere unterschiedliche mRNA-Moleküle entstehen.¹⁷⁵ Diese werden vom Kern zu den Ribosomen ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation stattfindet, im endoplasmatischen Retikulum können die Moleküle mehreren posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung unterzogen werden. Außerdem spielen auch die mRNA- und Proteinstabilität eine wichtige Rolle bei der Umsetzung von mRNA in Protein und dessen Expression auf der Zellmembran. Eine weitere Möglichkeit könnte auch sein, dass die Rezeptorexpression von A₁- und A₃-Adenosinrezeptoren zwar vorhanden ist, jedoch auf allen untersuchten Zelltypen in so geringem Ausmaß, dass sie zwar auf mRNA-Ebene sichtbar ist, jedoch mittels der durchgeführten Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien auf Proteinebene nicht detektierbar war.

Eine Tatsache, die an dieser Stelle unbedingt diskutiert werden muss, ist der Vorgang der Rezeptordesensibilisierung bzw. -internalisierung von auf der Zellmembran exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dafür wurden mehrere Mechanismen beschrieben, die auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktionskaskade G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eingreifen. Eine sehr schnelle Desensibilisierung, die meist schon wenige Minuten nach einer Agonist-Stimulierung des Rezeptors auftritt, wird über eine Phosphorylierung spezifischer Stellen des C-Terminus oder der intrazellulären

Schleifen eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch GPCR-spezifische Kinasen (GRK) und/oder Kinasen, die durch intrazelluläre Second-messenger reguliert werden (wie die cAMP-abhängige Proteinkinase) vermittelt.⁷³ Die phosphorylierten Rezeptoren binden daraufhin an eine Gruppe von Proteinen, die als Arrestine bezeichnet werden, was eine Abkoppelung des Rezeptors von seinen G-Proteinen zur Folge hat. Diese Abkopplung scheint auch bei einer Desensibilisierung über einen längeren Zeitraum aufzutreten, jedoch unabhängig von einer Phosphorylierung.⁷³ Daraufhin werden die Rezeptoren in intrazelluläre Kompartimente transportiert und entweder weiter degradiert oder nach einer bestimmten Zeit recycled und wieder auf der Zelloberfläche exprimiert. So führt z.B. eine Dauerstimulierung mit einem Agonisten zu einer Herunterregulierung der Rezeptoren und/oder der assoziierten G-Proteine.⁷³ Die Desensibilisierung bzw. Internalisierung geht von Rezeptorsubtyp zu Rezeptorsubtyp unterschiedlich schnell vonstatten,⁷³ so wurde etwa für den A₁AR beschrieben, dass dieser nur sehr schwer phosphoryliert wird und die Internalisierung eine typische Halbwertszeit von mehreren Stunden besitzt. Im Gegensatz dazu scheinen A_{2A}AR und A_{2B}AR eine wesentlich schnellere Internalisierung zu durchlaufen, meist in weniger als einer Stunde. Noch schneller geht dieser Vorgang typischerweise bei A₃AR vonstatten, bei diesem Subtyp ist die Desensibilisierung/Internalisierung meist nur eine Frage von Minuten.²²⁷ Von Gewebe zu Gewebe sind geringere Unterschiede beobachtet worden.

So ist es durchaus denkbar, dass auch A₁- und vor allem A₃-Adenosinrezeptoren auf T-Lymphozyten exprimiert wurden. Diese Rezeptoren könnten jedoch durch vermehrt ausgeschüttetes Adenosin (während der Strapazen der Membranpräparation und/oder des Versuches) infolge der Dauerstimulierung internalisiert worden sein und waren deshalb auf Proteinebene nicht mehr detektierbar. A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren würden dann auf Lymphozyten wesentlich langsamer desensibilisiert und internalisiert werden, was mit der G-Protein-Kopplung zusammenhängen könnte. A₁- und A₃-Adenosinrezeptoren sind G_i-gekoppelt, während A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren G_s-gekoppelte Rezeptoren sind. Aufgrund der oben genannten, typischen Internalisierungshalbwertszeiten der einzelnen Subtypen ist es jedoch sehr viel plausibler, auch diese Sachlage mit Hilfe des Konzeptes der A_{2A}-A_{2B}-Rezeptordimerisierung zu erklären. Wie schon in **Kapitel 2.3.4** beschrieben, kann eine Rezeptordimerisierung auch Auswirkungen auf die Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung haben, diese können bei den im Heterodimer beteiligten Rezeptoren entweder beschleunigt oder verlangsamt

sein. Letzteres wäre in dem hier vorliegenden Beispiel der Fall, die Internalisierungshalbwertszeit von $A_{2A}AR$ und $A_{2B}AR$ im Heteromer wäre durch die Heteromerisierung im Vergleich zu den monomeren Rezeptoren stark verlängert. Laut Theorie würden somit höchstwahrscheinlich A_3AR bereits nach wenigen Minuten durch das ausgeschüttete Adenosin als erster Subtyp langsam von der Zelloberfläche in das Zellinnere verschwinden, gefolgt von einer Internalisierung der A_1AR . $A_{2A}AR$ und $A_{2B}AR$ würden durch die Dimerbildung sehr unempfindlich gegen Internalisierungsmechanismen und nicht oder nur sehr langsam desensibilisiert/internalisiert werden. Für A_1AR wurde zusätzlich beschrieben, dass eine Internalisierung keine Veränderungen auf mRNA-Ebene hervorruft und höchstwahrscheinlich auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird,^{227,228} eine Tatsache, die die im Rahmen dieser Arbeit für A_1 - und A_3AR gefundenen Diskrepanzen zwischen mRNA- und Proteindaten gut erklärbar macht.

2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Untersuchung der Adenosinrezeptorexpression auf humanen T-Lymphozyten konnte auf Transkriptionsebene mittels Real-time-PCR mRNA für alle vier Adenosinrezeptorsubtypen auf allen untersuchten T-Lymphozyten – allerdings in unterschiedlichen Expressionslevels – gefunden werden. In unstimulierten, primären humanen T-Lymphozyten zeigte sich folgendes Bild: $A_{2A} \gg A_3 > A_1 = A_{2B}$, welches sich durch Stimulierung der Zellen mit PHA folgendermaßen veränderte: $A_{2A} \gg A_1 = A_3 > A_{2B}$. Hierbei war bemerkenswert, dass die ohnehin schon starke Expression der mRNA für den A_{2A} AR durch die Stimulierung noch weiter erhöht wurde, während die mRNA-Expressionen für A_{2B} und A_3 AR eher herunterreguliert wurden. Die Ergebnisse konnten auf Proteinebene mit Hilfe von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranpräparationen und intakten Zellen nur für A_{2A} AR und A_{2B} AR bestätigt werden, in unstimulierten Zellen konnte eine Rezeptorexpression gleicher Größenordnung für A_{2A} AR (B_{\max} von 3581 ± 2280 Bindungsstellen/Zelle) und A_{2B} AR (B_{\max} von 3240 ± 815 Bindungsstellen/Zelle) gemessen werden. Die A_{2A} AR-Expression wird durch eine Stimulierung der Zellen um das 3-fache auf 13588 ± 9939 Bindungsstellen/Zelle heraufreguliert, während die Expression des A_{2B} AR nahezu konstant bleibt (3994 ± 1343 Bindungsstellen/Zelle). Die bestimmten Affinitäten der Radioliganden zeigten, dass es sich bei A_{2A} AR und A_{2B} AR in primären humanen T-Lymphozyten um Rezeptoren mit einem für ihren Subtyp typischen pharmakologischen und biochemischen Profil handelt. Rezeptorexpression von A_1 AR und A_3 AR konnte nicht detektiert werden. In der humanen Leukämie-Zelllinie Jurkat T zeigte sich folgendes Expressionsmuster für Adenosinrezeptor-mRNA: $A_1 = A_{2A} = A_{2B} \gg A_3$. Es zeigte sich im Vergleich mit primären humanen T-Lymphozyten eine sehr viel stärkere mRNA-Expression für A_1 AR und A_{2B} AR, während mRNA für A_{2A} AR und A_3 AR in Jurkat T-Zellen eher schwächer exprimiert wurde als in primären humanen T-Lymphozyten. Bei der Verifizierung dieser auf Transkriptionsebene generierten Daten konnte mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranpräparationen, wie schon bei den primären T-Lymphozyten, in Jurkat T-Zellen auf Proteinebene die Expression von A_{2A} AR und A_{2B} AR mit B_{\max} -Werten von 4.56 ± 3.65 pmol/mg Protein bzw. 75.5 ± 20.5 pmol/mg Protein detektiert werden, die Rezeptorproteinexpression von A_1 AR und A_3 AR war kaum bzw. nicht detektierbar. Bei der Bestimmung der Affinitäten verschiedener Adenosinrezeptorligan-

den zeigte sich, dass sowohl A_{2A} - als auch A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen ein stark verändertes pharmakologisches Profil aufweisen, mit sehr viel geringeren Affinitäten der getesteten Liganden im Vergleich zu Rezeptoren in anderen Zellen/Geweben. Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals postuliert, dass dies evtl. mit einer Heterodimerisierung der A_{2A} - A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen zusammenhängen könnte. Hinweise auf eine Dimerisierung von Adenosinrezeptoren in primären humanen T-Lymphozyten konnten durch die durchgeführten Versuche nicht gewonnen werden. Die Dimerisierung könnte in Jurkat T-Zellen einen Deaktivierungsmechanismus für die beteiligten Rezeptoren darstellen, es scheint jedoch zusätzlich so zu sein, dass noch weitere Mechanismen zu den veränderten Affinitäten und Funktionalitäten beitragen. Allein durch eine Dimerisierung lassen sich die dargestellten Daten nur ungenügend erklären. Der endgültige wissenschaftliche Beweis dieser These bedarf aber auf jeden Fall weiterer Untersuchungen. So ist geplant, die beiden beteiligten Rezeptoren, A_{2A} und A_{2B} , in eine Zelllinie, die nativ keine Adenosinrezeptoren exprimiert wie z.B. CHO, zu transfizieren, wobei jeder Rezeptor über Fusionsproteine mit einem Fluoreszenzmolekül versehen werden soll, um die Rezeptorinteraktionen mittels FRET/BRET-Techniken sichtbar machen zu können. Außerdem könnten – sobald ein weiterer, selektiver A_{2B} AR-Radioligand mit ausreichender Löslichkeit zur Verfügung steht – weitere Radioligand-Rezeptor-Bindungsversuche an Jurkat T-Zellmembranen bzw. an A_{2B} AR in anderen Zellsystemen, die endogen A_{2A} - und A_{2B} AR koexprimieren, durchgeführt werden, um die Art und Anzahl der spezifischen Bindungsstelle(n) mittels Kompetitions- und Sättigungsexperimenten noch besser charakterisieren zu können, bzw. einen breiten Vergleich pharmakologischer Daten generieren. Auch wären zusätzliche Koimmunpräzipitationsstudien mit Jurkat T-Zellen bzw. den mit A_{2A} AR und A_{2B} AR-transfizierten CHO-Zellen denkbar, um die bis zu diesem Zeitpunkt erhaltenen Daten zur Heterodimerisierung zu überprüfen. Außerdem könnten Untersuchungen zur G-Protein-Kopplung der Rezeptoren und den weiterführenden Signalkaskaden Hinweise zur Veränderung der Pharmakologie und einer evtl. Heterodimerisierung bzw. der Beteiligung weiterer G-Proteine u.a. bringen. Ein weiterer interessanter Punkt für weiterführende Untersuchungen wäre die Klärung der Frage, ob sich das Phänomen der veränderten A_{2A} AR- und A_{2B} AR-Pharmakologie ausschliesslich bei einer signifikant höheren Expressionsdichte von A_{2B} AR im Vergleich zu A_{2A} AR auf Jurkat T-Zellen zeigt, oder ob diese Tatsache ebenfalls bei einer höheren A_{2A} AR-Expression zu sehen ist. Dafür wären Versuche denkbar, in denen die Zellen mit A_{2A} AR-selektiven Liganden

längere Zeit vorinkubiert wurden und dadurch ein Großteil der A_{2A}AR auf Jurkat T-Zellen internalisiert wird, sodass mehr A_{2A}- als A_{2B}-Adenosinrezeptoren exprimiert werden. Diese Versuche könnten auch weitere Erkenntnisse zur Dimerisierungstheorie bringen, da bekannt ist, dass sich Rezeptordimere auch in ihrem Internalisierungsverhalten beeinflussen können (siehe **Kapitel 2.4**) und eventuell kointernalisiert werden. Auch ein Rezeptor-KO von A_{2A}- bzw. A_{2B}AR auf Jurkat T- Zellen mit Hilfe von siRNA (*small interfering RNA*) wäre denkbar.

3 Charakterisierung der Adenosinrezeptor-vermittelten Calcium-Signale in humanen T-Lymphozyten

3.1 Einleitung

In den vorangehenden Kapiteln wurden bereits vielfältige Mechanismen beschrieben, mit denen Adenosin auf die Entwicklung und Funktion des Immunsystems Einfluss nehmen kann. Dies geschieht hauptsächlich über die Aktivierung von membranständigen Adenosinrezeptoren, wobei hier vor allem die A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptorsubtypen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Ihre Expression konnte auf vielen Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 1**) und im Rahmen dieser Arbeit für humane T-Lymphozyten – sowohl auf primären humanen T-Lymphozyten als auch auf der Leukämie-T-Zelllinie Jurkat T auf Transkriptions- und Proteinebene – bestätigt werden (**Kapitel 2**). Es ist seit längerem bekannt, dass beide Adenosinrezeptoren der A_2 -Subtypen in primären T-Lymphozyten und auch in Jurkat T-Zellen stimulatorisch an die Adenylatcyclase gekoppelt sind, sodass eine Aktivierung der Rezeptorproteine einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Folge hat.^{160,161,163} Eine Stimulierung des A_{2B} -Adenosinrezeptors und der damit verbundene Anstieg der cAMP-Konzentration kann zudem durch eine T-Zell-Rezeptor-Stimulierung und dem damit verbundenen Calciumeinstrom bzw. der Stimulierung der Proteinkinase C verstärkt werden.⁶⁰ Für den A_{2B} -Adenosinrezeptor auf Jurkat T-Zellen wurde zudem gezeigt, dass er an intrazelluläre Calcium-Kanäle gekoppelt ist und seine Aktivierung zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums über einen Inositoltrisphosphat- und cGMP-unabhängigen Mechanismus führt. Der beteiligte Botenstoff („*Second Messenger*“) ist bis heute nicht bekannt, klar ist nur, dass die Erhöhung des Calciumspiegels unabhängig von der gerade beschriebenen Calciummobilisierung durch Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ist.⁶⁴ Daniela Bertarelli konnte im Rahmen ihrer Dissertation zeigen, dass zusätzlich über eine Stimulierung von A_{2B} -Adenosinrezeptoren auch durch A_{2A} -Adenosinrezeptoren auf Jurkat T-Zellen ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden kann, jedoch kommt dieser Anstieg aller Wahrscheinlichkeit nach über einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum über die Beeinflussung membranständiger Calciumkanäle zustande, nicht über eine Calci-

ummobilisierung aus intrazellulären Speichern.¹⁶⁷ Sieht man also von der Möglichkeit ab, dass die $\beta\gamma$ -Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren membranständige Calciumkanäle ohne Beteiligung der Phospholipase C auch direkt aktivieren kann,²²⁹ so kommen an intrazelluläre Calciumspeicher gekoppelte Second Messenger in Jurkat T-Zellen also nur für das A_{2B} -Adenosinrezeptor-vermittelte Calciumsignal in Betracht. Hier gibt es mehrere Möglichkeiten: Neben Inositoltrisphosphat werden weitere Second Messenger beschrieben, die eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirken können, so z.B. die cyclische ADP-Ribose, die über Ryanodin-Rezeptoren an intrazelluläre Calciumspeicher gekoppelt ist.²³⁰ Ebenfalls vermittelt Nikotinsäure-Adenindinukleotidphosphat (NAADP) eine Mobilisierung von intrazellulärem Calcium.²³¹ Eine intrazelluläre Calciumantwort kann auch über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins vermittelt werden,²³² Beispiele hierfür sind A_1 und A_3 -Adenosinrezeptoren, bei denen die $\beta\gamma$ -Untereinheiten an der direkten Kopplung des Rezeptorproteins mit der Phospholipase C beteiligt.^{233,234}

A_1 - und A_3 -Adenosinrezeptoren scheinen in Jurkat T-Zellen nicht an einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beteiligt zu sein.¹⁶⁷

Ziel des vorliegenden Projektes war es deshalb, die Calcium-Mobilisierung über Adenosinrezeptoren, vor allem über Rezeptoren der A_2 -Subtypen, auf Jurkat T-Zellen und primären humanen T-Lymphozyten zu untersuchen. Die Versuche wurden fluorimetrisch mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green[®] durchgeführt, das genaue Vorgehen ist in **Kapitel 7**, Material und Methoden beschrieben.

3.2 Fluorimetrische Calciummessungen an Jurkat T-Zellen

Wie zuvor gezeigt⁶⁴ und in unserem Arbeitskreis mehrfach reproduziert werden konnte,^{167,235} ist der unselektive Adenosinrezeptor-Agonist **NECA** in der Lage, ein Calcium-Signal in Jurkat T-Zellen zu induzieren. Mirabet *et al.* schrieben dieses Signal ausschließlich der Aktivierung von A_{2B} -Adenosinrezeptoren zu, Daniela Bertarelli konnte allerdings zeigen, dass auch A_{2A} -Adenosinrezeptoren an der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Jurkat T-Zellen beteiligt sein können.¹⁶⁷

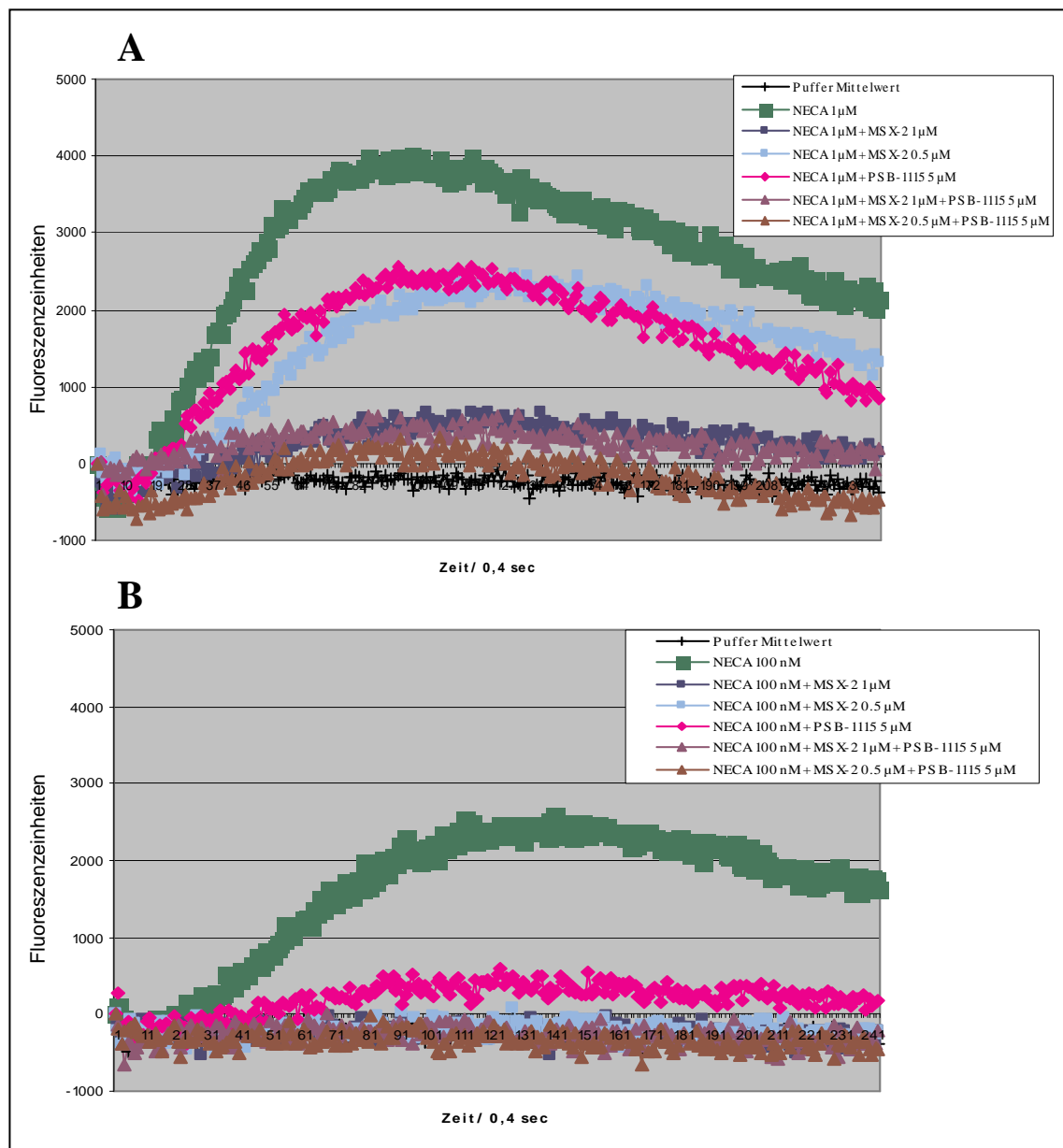


Abb. 3-26: Calciumsignal in Jurkat T-Zellen induziert durch **A.** 1 µM und **B.** 100 nM NECA in Anwesenheit bzw. Abwesenheit verschiedener Konzentrationen des A_{2A} AR-Antagonisten MSX-2 bzw. des A_{2B} AR-Antagonisten PSB-1115. Abgebildet ist jeweils eine repräsentative Kurve aus drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, siehe **Abb. 3-26** und **3-27**. Das bei einer **NECA**-Konzentration von 1 μM induzierte Calciumsignal konnte durch die alleinige Zugabe des $\text{A}_{2\text{A}}$ AR-Antagonisten **MSX-2** bzw. des $\text{A}_{2\text{B}}$ AR-Antagonisten **PSB-1115** jeweils in seiner Intensität deutlich etwa um die Hälfte vermindert werden, die Kombination der beiden Antagonisten ergab eine nahezu vollständige Hemmung des Calciumsignals, siehe **Abb. 3-26 A** und **3-27**. Dies deutet sehr stark darauf hin, dass sowohl die Stimulierung von $\text{A}_{2\text{A}}$ - als auch von $\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptoren einen Beitrag zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Jurkat T-Zellen leistet. Zusätzlich wird diese These durch den Verlauf der Dosis-Wirkungskurve des durch **NECA** induzierten Calciumsignals gestützt, wobei ein Zwei-Bindungsstellenmodell die Kurve besser beschreiben kann mit einem $r^2 = 0.9987$ als ein Ein-Bindungsstellenmodell mit einem r^2 von 0.9843 (siehe **Abb. 3-28**). Aus dieser Dosis-Wirkungskurve lassen sich folgende EC_{50} -Werte für **NECA** errechnen: 0.138 μM für Bindungsstelle 1 (vermutlich $\text{A}_{2\text{A}}$ AR) bzw. 32.9 μM für Bindungsstelle 2 (vermutlich $\text{A}_{2\text{B}}$ AR). Bei einer **NECA**-Konzentration von 100 nM konnte das induzierte Calciumsignal bereits sowohl durch die alleinige Zugabe des $\text{A}_{2\text{A}}$ AR-Antagonisten **MSX-2**, als erstaunlicherweise auch durch alleinige Zugabe des $\text{A}_{2\text{B}}$ AR-Antagonisten **PSB-1115** nahezu vollständig gehemmt werden; auch eine Kombination der beiden Antagonisten verhinderte das Calciumsignal nahezu vollständig, siehe **Abb. 3-26 B** und **3-27**. Dies ist insofern nicht zu erwarten, da man bei einer **NECA**-Konzentration von 100 nM damit rechnen dürfte, dass nur die – im Vergleich zu $\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptoren – höher affinen $\text{A}_{2\text{A}}$ -Adenosinrezeptoren aktiviert werden und damit das **NECA**-vermittelte Calciumsignal nur durch $\text{A}_{2\text{A}}$ -Adenosinrezeptor-selektive Antagonisten wie **MSX-2** vollständig geblockt werden kann, nicht jedoch von $\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptor-selektiven Antagonisten wie **PSB-1115**. Genau dies scheint jedoch der Fall zu sein. Diese Tatsache erscheint umso erstaunlicher wenn man in Betracht zieht, dass im Rahmen dieser Arbeit durch Auswertung der Dosis-Wirkungskurve von **NECA** mittels eines Zwei-Bindungsstellenmodells gezeigt werden konnte, dass der EC_{50} -Wert für **NECA** an Bindungsstelle 2 ($\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptoren) in Jurkat T-Zellen bei 32.9 μM liegt (siehe **Abb. 3-28**) und damit eine eingesetzte **NECA**-Konzentration von 100 nM diese Bindungsstellen-Population theoretisch nur in sehr geringem Ausmaß besetzen und aktivieren kann. Somit dürfte eine Blockade dieser Bindungsstellen durch einen selektiven Antagonisten auch nur geringe Auswirkungen auf das durch diese **NECA**-Konzentration

induzierte Calciumsignal haben. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

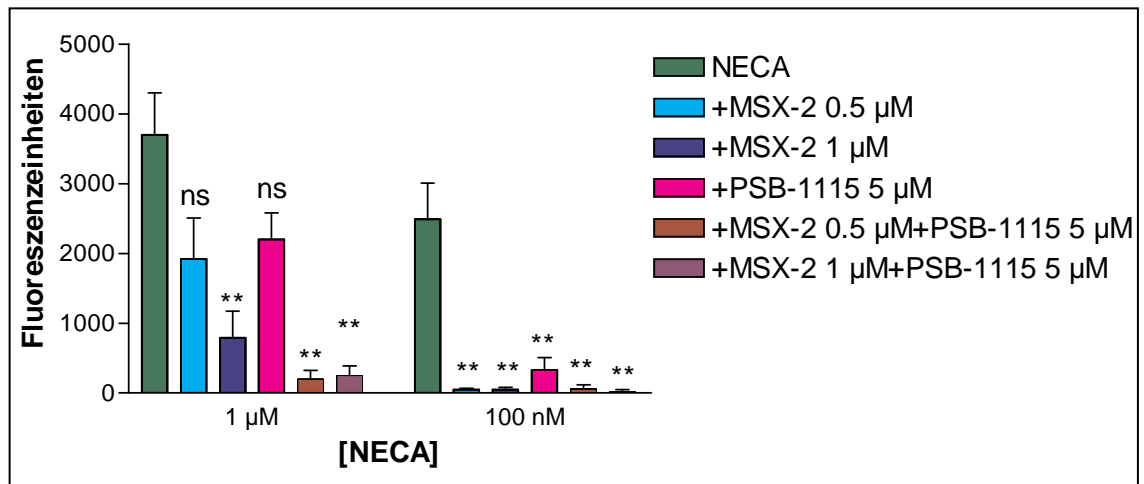


Abb. 3-27: Calciumsignal in Jurkat T-Zellen induziert durch NECA in Anwesenheit bzw. Abwesenheit verschiedener Konzentrationen des A_{2A} AR-Antagonisten MSX-2 bzw. des A_{2B} AR-Antagonisten PSB-1115, $n=3 \pm$ SEM.

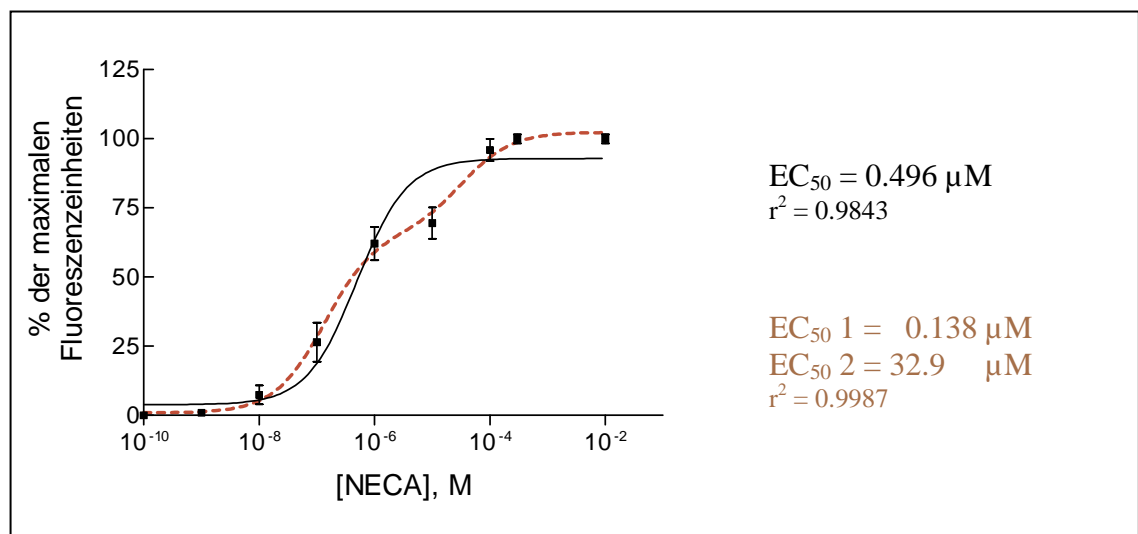


Abb. 3-28: Dosis-Wirkungskurve für das durch NECA induzierte Calciumsignal in Jurkat T-Zellen, ausgewertet nach dem Ein-Bindungsstellenmodell (—) bzw. nach dem Zwei-Bindungsstellenmodell (---), $n=3 \pm$ SEM.

Auch diese Besonderheit könnte jedoch mit der postulierten Rezeptordimerisierung von A_{2A} - mit A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen erklärt werden. Durch Besetzung eines Rezeptors im Heteromer mit einem Subtyp-selektiven Antagonisten ändert sich die Konformation und Struktur des zweiten beteiligten Rezeptors vor allem im Bereich der Bindungstasche derartig, dass **NECA** auch an diesen Rezeptorsubtyp nicht mehr ausreichend gut binden kann, um ein vollständiges bzw. überhaupt ein Calciumsignal zu

vermitteln. Dies wäre natürlich für geringe **NECA**-Konzentrationen sehr viel relevanter als für hohe **NECA**-Konzentrationen. Auch denkbar wäre eine Auswirkung der Heterodimerisierung auf die G-Protein-Kopplung und nachgeschaltete Signaltransduktionswege. Nach der Bindung eines ersten Subtyp-selektiven Antagonisten würde demnach der unselektive Adenosinrezeptor-Agonist **NECA** zwar noch an die Rezeptoren binden, das Agonistsignal könnte jedoch durch Veränderung der G-Protein-Kopplung oder anderer nachgeschalteter Signaltransduktionswege nicht korrekt weitergeleitet werden. Die Heterodimerisierung und die durch die Antagonist-Bindung induzierte Konformationsänderung der beteiligten Rezeptoren würde somit für eine Veränderung der Signaltransduktion verantwortlich sein. Auch hier könnten, wie schon in **Kapitel 2.4** postuliert, zusätzlich weitere Proteine wie z.B. Arrestine oder GRKs eine Rolle spielen, die aufgrund der Antagonist-bedingten Konformationsänderung in irgendeiner Form in Wechselwirkung mit den Rezeptoren treten und die Signaltransduktion – in diesem Fall die untersuchte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung – beeinflussen und hemmen.

Die seit langem bekannte Kopplung der A_2 -Adenosinrezeptoren an die Adenylatcyclase scheint in Jurkat T-Zellen ebenfalls – im Vergleich zu A_2 -Adenosinrezeptoren in anderen Zellsystemen – verändert zu sein. So fanden Van der Ploeg *et al.* durch funktionelle cAMP-Messungen, dass in Jurkat T-Zellen sehr viel niedrigere basale cAMP-Konzentrationen als in PC-12-Zellen vorherrschen.¹⁶³ Der maximale **NECA**-Effekt war in Jurkat T-Zellen wesentlich geringer und auch die Aktivitäten (EC_{50} -Werte) von **NECA** waren im Vergleich zu PC-12-Zellen um das 30-fache in Abwesenheit von Forskolin ($5.8 \pm 0.8 \mu M$ vs. $0.2 \pm 0.02 \mu M$) bzw. um den Faktor 80 in Anwesenheit von Forskolin ($2.4 \pm 0.8 \mu M$ vs. $0.03 \pm 0.006 \mu M$) vermindert.¹⁶³ In PC-12-Zellen war kein signifikanter Unterschied der Aktivitäten und maximalen Effekte zwischen **NECA** und **CGS21680** erkennbar. Eine völlig andere Situation zeigte sich in Jurkat T-Zellen: In Abwesenheit von Forskolin war **CGS21680** erstaunlicherweise inaktiv. Auch in Anwesenheit von Forskolin war der maximale Effekt von **CGS21680** in diesen Zellen sehr viel geringer als der maximale **NECA**-Effekt, der EC_{50} -Wert für **CGS21680** in Jurkat T-Zellen war ca. 200-fach höher als in PC-12-Zellen ($4.4 \pm 2.5 \mu M$ vs. $0.024 \pm 0.005 \mu M$).¹⁶³ Die Testung weiterer Verbindungen bestätigte diese ersten Ergebnisse.¹⁶³ Diskutiert wurden die Beobachtungen mit einer unterschiedlichen Rezeptorexpression der beiden A_2 -Adenosinrezeptorsubtypen auf den untersuchten Zelltypen. Da dieser Erklärungsansatz die weiteren – u.a. im Rahmen dieser Arbeit gefundenen – Ergebnisse nur

sehr unzureichend beschreiben kann, bedarf die Aufklärung der genauen Signaltransduktionsmechanismen in Jurkat T-Zellen – die augenscheinlich einige Besonderheiten besitzen – auf jeden Fall weiterer Forschungsbemühungen.

3.3 Fluorimetrische Calciummessungen an primären humanen T-Lymphozyten

Analog zu den Untersuchungen der humanen Leukämie-T-Zelllinie Jurkat T sollte auch in primären humanen T-Lymphozyten untersucht werden, ob Adenosinrezeptorliganden in der Lage sind, ein Calciumsignal zu induzieren. Bereits Mirabet *et al.* und auch Gessi *et al.* führten erste Versuche zur Messung der intrazellulären IP_3 - bzw. Ca^{2+} -Konzentrationen nach Stimulierung der Adenosinrezeptoren mit **NECA** an diesen Zellen durch. In beiden Studien konnte unabhängig voneinander jedoch keinerlei Anstieg – weder der IP_3 - noch der Ca^{2+} -Konzentration – nach Agonistaktivierung der Adenosinrezeptoren auf primären humanen T-Lymphozyten festgestellt werden.^{158,160} Es wurde daraufhin postuliert, dass $\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptoren in primären humanen Lymphozyten nicht an die Phospholipase C gekoppelt sind.¹⁶⁰

Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien an primären humanen T-Lymphozyten konnten keinen eindeutigen, signifikanten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Aktivierung der Adenosinrezeptoren durch den unselektiven Agonisten **NECA** zeigen. In unstimulierten Zellen war nach Zugabe von **NECA** überhaupt keine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration zu beobachten (siehe **Abb. 3-29 A**), während in PHA-stimulierten Zellen ein leichter Kurvenverlauf zu erkennen ist (siehe **Abb. 3-29 B**), der allerdings nahezu vollständig unterhalb des Kontrollniveaus, der schwarzen Pufferkurve, verläuft. Es handelt sich dabei außerdem nicht um einen Dosis-abhängigen Effekt von **NECA**, wie aus der Zusammenfassung der Daten mehrerer Versuche, dargestellt in **Abb. 3-30 B**, rote Balken, ersichtlich wird. Auffallend ist an **Abb. 3-30 B** außerdem, dass eine kurze Vorinkubation mit dem unselektiven Adenosinrezeptor-Antagonisten **Coffein** scheinbar in der Lage ist, das **NECA**-vermittelte Calciumsignal in stimulierten Zellen zu verstärken, vor allem bei hohen **NECA**-Konzentrationen. Da dabei die intrazelluläre Calciumkonzentration erst nach Zugabe von **NECA** anzusteigen beginnt, kann man davon ausgehen, dass es sich wirklich um einen synergistischen Effekt von **NECA** und **Coffein** handelt. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Effektes scheinen jedoch unerlässlich. Weiter ist in **Abb. 3-30 B** zu erkennen, dass bei einer **NECA**-Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ der dadurch in stimulierten primären T-Lymphozyten vermittelte Calciumeffekt durch eine kurze

Vorinkubation mit dem selektiven A_{2A} AR-Antagonisten **MSX-2** bzw. durch die Kombination von **MSX-2** mit dem A_{2B} AR-Antagonisten **PSB-1115** vermindert werden kann.

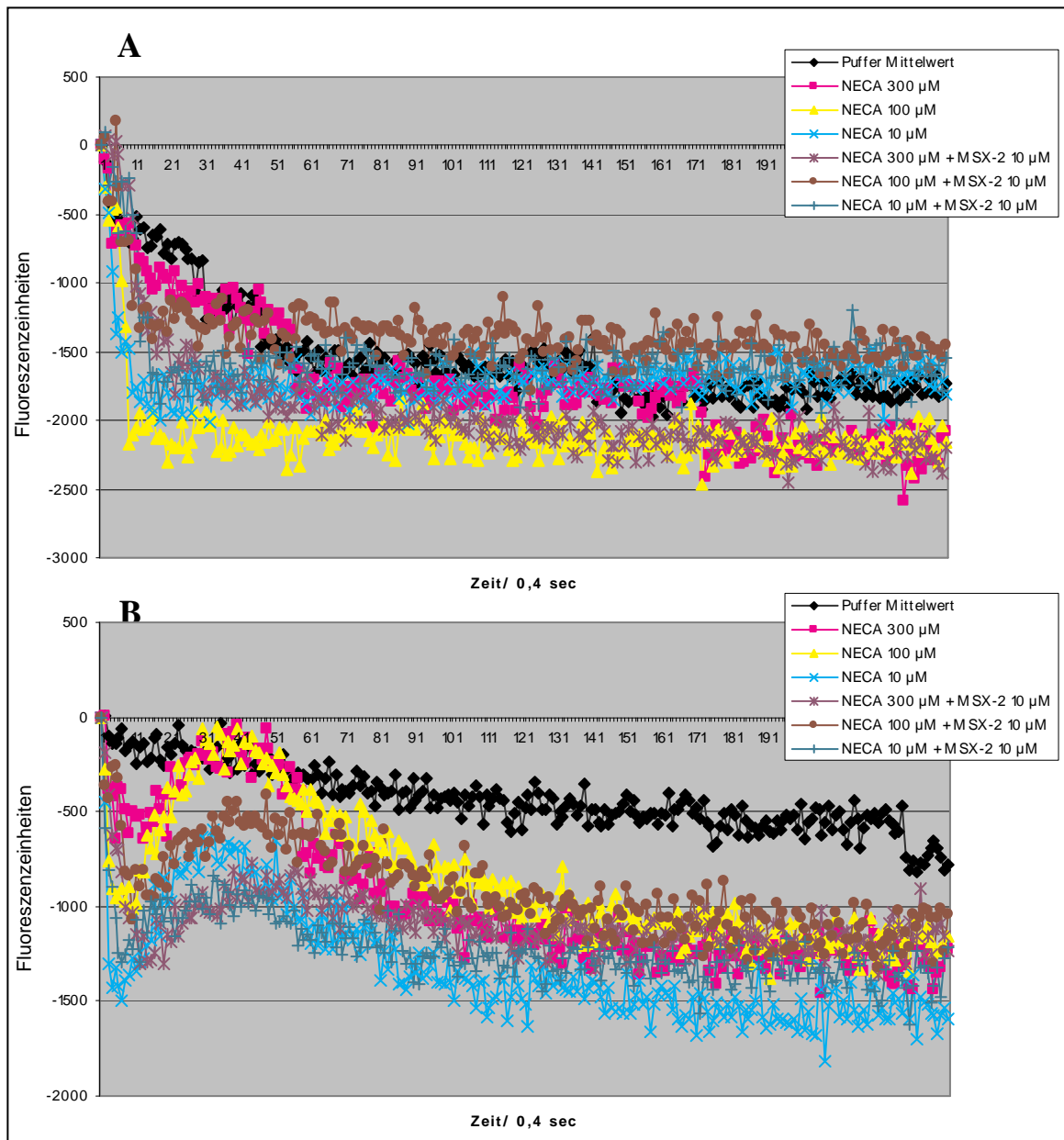


Abb. 3-29: Calciumsignal in **A** unstimulierten und **B** PHA-stimulierten primären humanen T-Lymphozyten, induziert durch NECA in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des A_{2A} AR-Antagonisten MSX-2 (10 μ M). Abgebildet ist jeweils eine repräsentative Kurve aus drei unabhängigen Experimenten.

Diese Beobachtung ist insofern interessant, als im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Expression von A_{2A} -Adenosinrezeptoren im Laufe einer Stimulierung primärer humaner T-Lymphozyten hochreguliert wird. Dies könnte darauf hindeuten, dass das **NECA**-vermittelte Calciumsignal in primären humanen T-Lymphozyten hauptsächlich A_{2A} AR-vermittelt ist. In unstimulierten Zellen wäre demnach die A_{2A} AR-Expression zu gering, um ein Calciumsignal auslösen zu können, durch die Hochregu-

lierung der Rezeptorexpression während einer Stimulierung könnte dann in stimulierten Zellen ein Calciumsignal möglich werden.

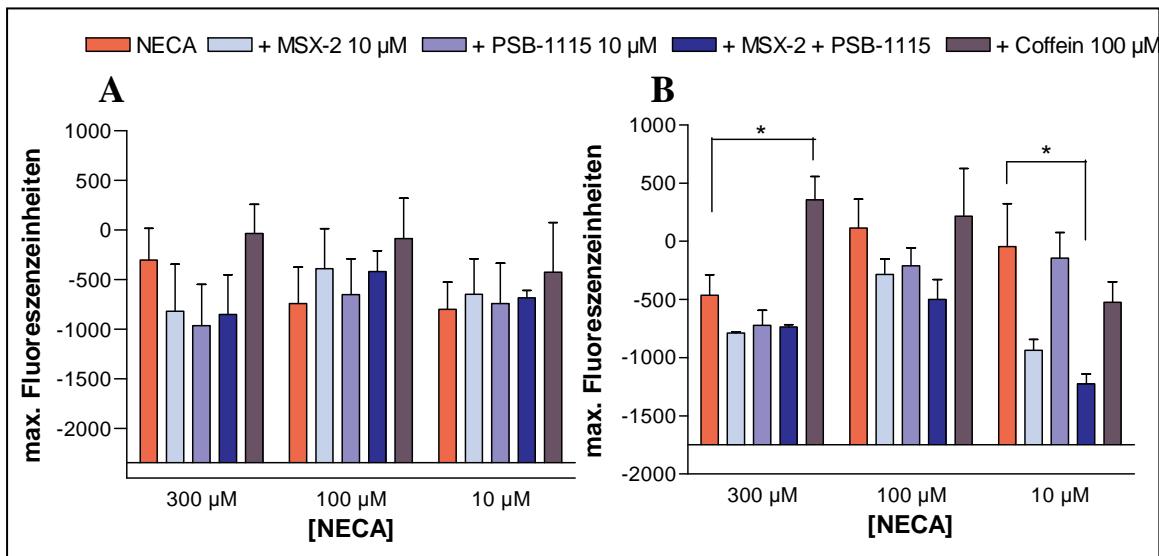


Abb. 3-30: Calciumsignal in **A** unstimulierten und **B** PHA-stimulierten primären humanen T-Lymphozyten, induziert durch NECA (verschiedene Konzentrationen) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des A_{2A} AR-Antagonisten MSX-2 (10 µM), des A_{2B} AR-Antagonisten PSB-1115 (10 µM) sowie des unselektiven Antagonisten Coffein (100 µM), $n=4 \pm$ SEM. Signifikanzen wurden für die jeweilige NECA-Konzentration bezogen auf die alleinige Gabe von NECA berechnet, keine Angabe bedeutet nicht signifikant ($P>0.05$).

Zu klären bliebe dabei allerdings die Frage, warum das beobachtete Calciumsignal in stimulierten primären T-Lymphozyten nur sehr schwach und kaum messbar ist. Um einen Vergleich zu haben, welche Ausmaße ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach einer Rezeptorstimulierung in primären humanen T-Lymphozyten annehmen kann, wurde der Effekt der beiden P2-Rezeptoragonisten Adenosintriphosphat (**ATP**) und Uridintriphosphat (**UTP**) gemessen. Primäre humane T-Lymphozyten exprimieren mehrere P2-Rezeptorsubtypen,^{236,237} dabei scheinen $P2X_4$, $P2X_7$, $P2Y_2$ und $P2Y_{12}$ stark exprimiert zu werden.²³⁶ $P2Y_2$ -Rezeptoren sind G_q -gekoppelt, wodurch eine Stimulierung dieser Rezeptoren durch die beiden physiologischen Agonisten **ATP** und **UTP** jeweils einen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ über die Aktivierung der Phospholipase C_β zur Folge hat.

Wie aus der in **Abb. 3-32** dargestellten Beispielkurve für das **ATP**-induzierte Calciumsignal in unstimulierten primären humanen T-Lymphozyten ersichtlich, ist **ATP** (aber auch **UTP**) in der Lage, einen deutlichen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg – vermutlich hauptsächlich $P2Y_2$ -Rezeptor-vermittelt – zu induzieren. **ATP** und **UTP** zeigten dabei Effekte sowohl

in unstimulierten als auch in PHA-stimulierten Zellen. Die Dosis-Wirkungskurven sind in **Abb. 3-32** dargestellt, die EC_{50} -Werte von **ATP** lagen bei 1.63 bzw. 10.0 μM in unstimulierten bzw. stimulierten Zellen, **UTP** zeigte EC_{50} -Werte von 0.245 bzw. 5.27 μM . Die EC_{50} -Werte waren dabei jeweils an unstimulierten und stimulierten primären humanen T-Lymphozyten nicht signifikant unterschiedlich. Damit konnte gezeigt werden, dass auch in primären humanen T-Lymphozyten eindeutig ein Rezeptor-vermittelter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg stattfinden kann, der mittels der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden auch erfasst werden kann.

Vergleicht man das sehr schwache, mittels **NECA** an stimulierten primären T-Lymphozyten induzierte Calciumsignal (**Abb. 3-29 B**) mit dem ausgeprägten, durch **ATP/UTP** ausgelösten Calciumsignal in primären humanen T-Lymphozyten (**Abb. 3-31**), so fällt auf, dass der **NECA**-vermittelte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg sehr viel langsamer stattfindet als der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg induziert durch **ATP/UTP**. Dies deutet möglicherweise auf unterschiedliche Signaltransduktionswege hin.

Es kann also festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Arbeit weder ein eindeutiger **NECA**- bzw. Adenosinrezeptor-vermittelter Effekt auf die intrazelluläre Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in primären humanen T-Lymphozyten festgestellt werden konnte, noch konnte eine Kopplung von Adenosinrezeptoren an intrazelluläre Calciumspeicher bzw. evtl. membranständige Calciumkanäle in diesen Zellen vollständig ausgeschlossen werden, vor allem in stimulierten Zellen. Somit bedürfen die Effekte von Adenosinrezeptoren auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in primären humanen T-Lymphozyten auf jeden Fall weiterer Forschungsbemühungen.

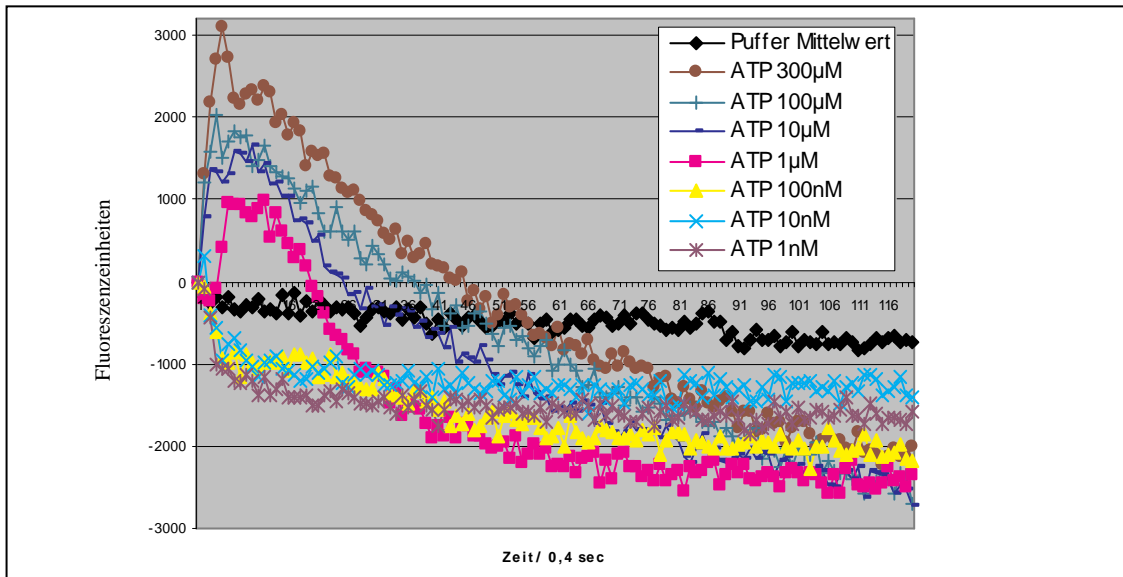


Abb. 3-31: Calciumsignal in unstimulierten primären humanen T-Lymphozyten, induziert durch verschiedene Konzentrationen von ATP. Abgebildet ist eine repräsentative Kurve aus drei unabhängigen Experimenten.

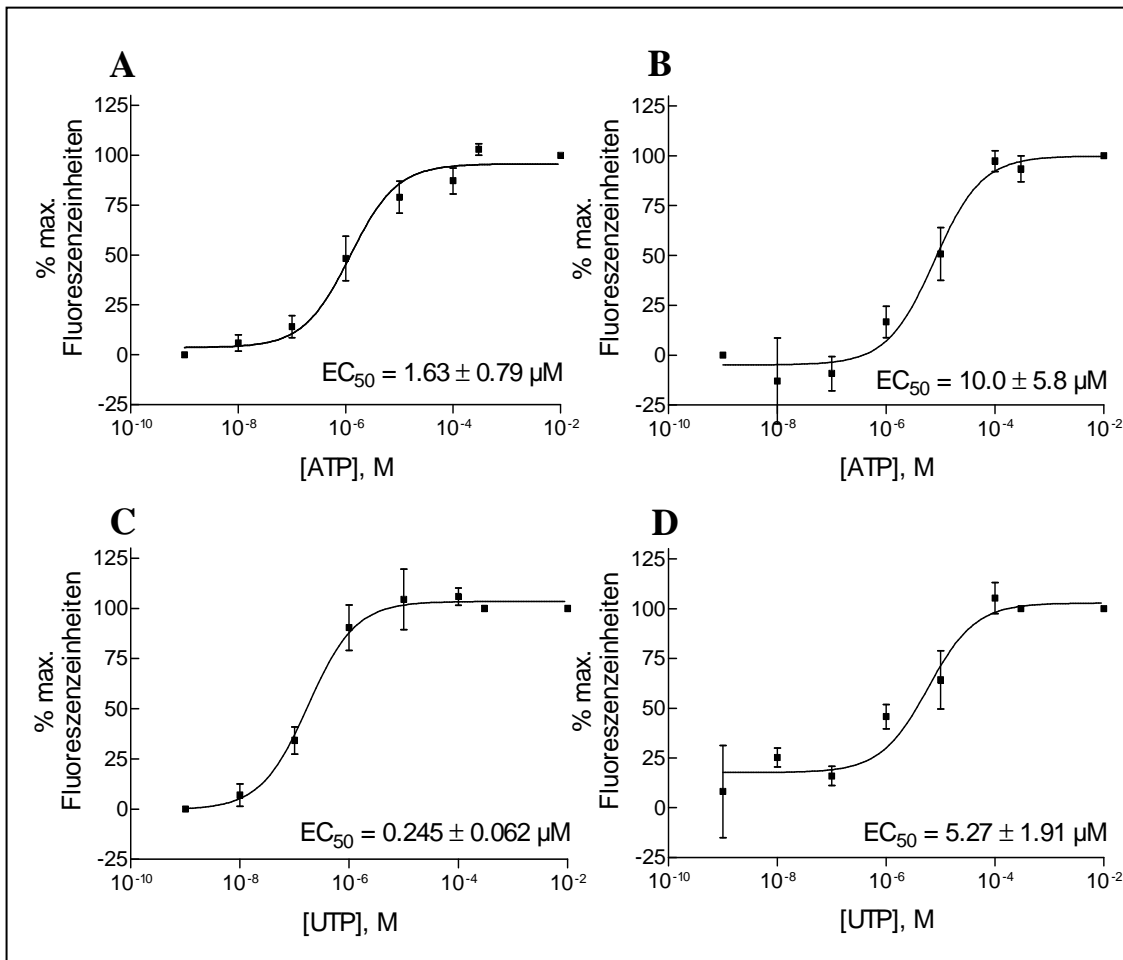


Abb. 3-32: Dosis-Wirkungskurven für die durch **A.** ATP in unstimulierten, **B.** ATP in stimulierten, **C.** UTP in unstimulierten und **D.** UTP in stimulierten primären humanen T-Lymphozyten induzierten Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$, $n=3 \pm \text{SEM}$. Die ermittelten EC_{50} -Werte für ATP bzw. UTP unterscheiden sich jeweils nicht signifikant zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen ($P=0.2260$ bzw. $P=0.0582$).

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Calcium-Mobilisierung über Adenosinrezeptoren, vor allem über A₂-Rezeptorsubtypen, sowohl auf Jurkat T-Zellen als auch auf primären humanen T-Lymphozyten untersucht. Für Jurkat T-Zellen konnten dabei Ergebnisse reproduziert werden die zeigen, dass beide Subtypen, sowohl A_{2A}- als auch A_{2B}-Adenosinrezeptoren, an der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch den unselektiven Adenosinrezeptoragonisten **NECA** beteiligt sind.¹⁶⁷ A_{2A}-Adenosinrezeptoren scheinen die intrazelluläre Calciumkonzentration über einen Einstrom extrazellulären Calciums über membranständige Kanäle zu beeinflussen, während A_{2B}-Adenosinrezeptoren auf Jurkat T-Zellen nach einer Aktivierung höchstwahrscheinlich über einen IP₃-unabhängigen Mechanismus Calcium aus intrazellulären Speichern zu mobilisieren vermögen.¹⁶⁷ Erstaunlicherweise konnte ein vermeintlich A_{2A}AR-vermitteltes Calciumsignal nicht nur durch selektive A_{2A}-Adenosinrezeptor-Antagonisten, sondern ebenfalls über einen selektiven Antagonisten am A_{2B}-Adenosinrezeptor (teilweise) blockiert werden. Ein plausibler Erklärungsansatz wäre die im Rahmen dieser Arbeit postulierte Rezeptordimerisierung zwischen A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren auf Jurkat T-Zellen (siehe **Kapitel 2**). Zu klären bliebe hierbei auf jeden Fall die Frage nach den beteiligten Second messengern in Kombination mit der weiteren Verfolgung bzw. dem endgültigen Beweis für die postulierte Rezeptordimerisierung.

Für primäre humane T-Lymphozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit – anders als für Jurkat T-Zellen - weder ein eindeutiger **NECA**- bzw. Adenosinrezeptor-vermittelter Effekt auf die intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt werden, noch konnte eine Kopplung von Adenosinrezeptoren an intrazelluläre Calciumspeicher bzw. evtl. membranständige Calciumkanäle in diesen Zellen vollständig ausgeschlossen werden, vor allem in stimulierten Zellen. Somit bedürfen die Effekte von Adenosinrezeptoren auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in primären humanen T-Lymphozyten auf jeden Fall weiterer Forschungsbemühungen.

4 Einfluss von Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation humaner T-Lymphozyten

4.1 Einleitung

4.1.1 Proliferation humaner Lymphozyten

Humane periphere Blutlymphozyten (PBL) befinden sich – frisch isoliert – in der G_0 -Phase des Zellzyklus, sie sind sogenannte ruhende Lymphozyten. Kommen diese Zellen in Kontakt mit einem Mitogen, so treten sie in die G_1 -Phase ein²³⁸ und schon wenige Minuten später zeigen sich erste biochemische Effekte und morphologische Veränderungen. Zelluläre Konzentrationen von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) steigen an,²³⁹ PRPP ist eine gemeinsame Vorstufe von Purin- und Pyrimidinnukleotiden, deren Konzentration als einer der wichtigsten regulatorischen Faktoren der *de novo*-Pathway-Aktivität der Purinbiosynthese angesehen wird.²⁴⁰ Es gibt mehrere Anhaltspunkte dafür, dass der *de novo*-Pathway der Purinbiosynthese essentiell für die Lymphozytenproliferation ist und der *salvage*-Pathway dabei nur eine untergeordnete Rolle spielt.²⁴¹ Es konnte gezeigt werden, dass für die frühen Schritte der mitogenen Aktivierung von T-Lymphozyten Ca^{2+} von essentieller Bedeutung ist^{242,243} - zum Beispiel für die Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, NF-AT oder CREB, die daraufhin in den Nukleus wandern und dort Gene anschalten.^{243,244} So ist die IL-2-Genaktivierung und die dadurch bedingte verstärkte Ausschüttung von IL-2 und die erhöhte Expression eines spezifischen IL-2-Rezeptors (CD25) Ca^{2+} -abhängig.²⁴⁵ Die autokrine Aktivierung von IL-2-Rezeptoren resultiert in einer verstärkten Expression des Transferrin-Rezeptors (CD71), dessen Aktivierung durch Serum-Transferrin in der späten G_1 -Phase des Zellzyklus notwendig für einen Übergang in die S-Phase ist.²³⁸ Die benötigten Ca^{2+} -Konzentrationen werden über Ionenkanäle aus dem Extrazellulärraum und durch Leerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher mobilisiert.²⁴³ Außerdem werden Inositolphospholipide hydrolysiert, Membran- sowie Zytoplasmaproteine phosphoryliert,²⁴⁶ die Proteinkinase C und damit der MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert und zellmembranständige Ionenkanäle depolarisiert.²⁴⁷ Morphologische Veränderungen sind bis

zu 12 h nach Stimulierung der Lymphozyten zu beobachten.²⁴⁶ Bereits in der ersten Stunde nach Kontakt mit dem Mitogen kann ein Anstieg der Gesamt-RNA gemessen werden, die stimulierten Lymphozyten synthetisieren dann 24 bis 48 h lang weiter verstärkt RNA.^{248,249} Die nachfolgende DNA- und Proteinsynthese (S-Phase) und daran anschließend die Zellteilung (M-Phase) beginnen etwa 24 h bis 36 h nach der Zugabe von Mitogen.^{241,249} Es folgen typischerweise – zum Beispiel nach Stimulation mit einem Antigen – mehrere, bis zu sieben sequentielle Zellteilungszyklen,^{250,251} die über sieben bis zehn Tage anhalten können,²⁴⁶ danach werden die Zellen über Apoptosemechanismen eliminiert.

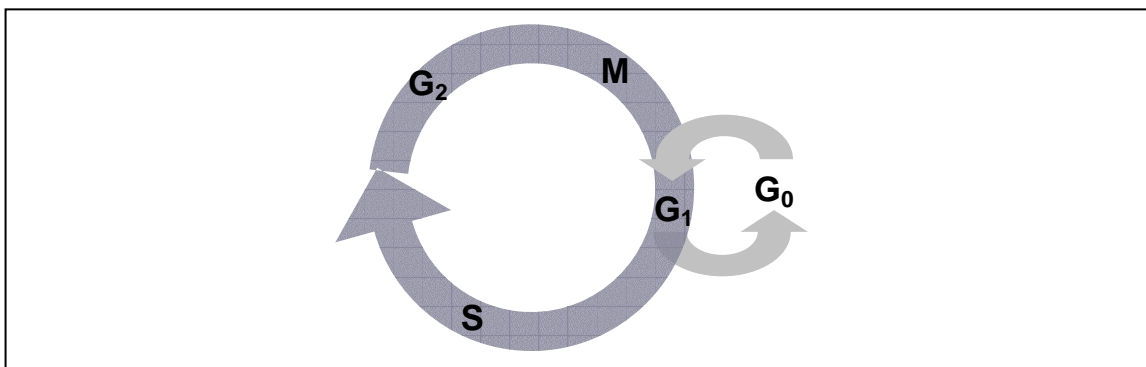


Abb. 4-33: Schematische Darstellung des Zellzyklus.

Zellen haben in der G₁-Phase die Möglichkeit, den Zellzyklus zu verlassen und in einen Ruhezustand überzugehen (G₀-Phase), die Zellen sind dann biochemisch aktiv, teilen sich aber nicht und kehren erst durch Stimulation wieder zurück in den Zell(teilungs)zyklus. Durch den Übertritt des Restriktionspunktes am Ende der G₁-Phase sind die Zellen zum Durchlauf des kompletten Zyklus und damit zur Zellteilung verpflichtet.

G-Phase: Lückenphase (*Gap*-Phase), ermöglichen eine Kontrolle, ob die vorhergehende Zyklusphase korrekt durchgeführt und abgeschlossen wurde und ob Schädigungen der genetischen Information vorliegen.

S-Phase: Synthesephase, Verdopplung der DNA.

M-Phase: Mitosephase, Verteilung der neu synthetisierten DNA auf die beiden Tochterzellen.

Auch konnten mehrere Protoonkogene – Gensequenzen, die im normalen Zellstoffwechsel und Wachstum eine wesentliche Rolle spielen, die aber durch Mutation oder Überexpression eine maligne Zelltransformation und damit eine Tumorbildung bewirken können – identifiziert werden, die im Laufe der Mitogenese humaner Lymphozyten eine Rolle zu spielen scheinen: so werden bereits 10 min nach der Stimulierung erhöhte mRNA-Level für *c-fos* und *c-myc* gefunden, binnen 14 h wird die Expression der Protoonkogene *c-myb* (IL-2 getriggert), p53 und N-*ras* erhöht und nach 24 bis 36 h für H3. Die Expression von mRNA für *c-abl*, *c-ets* und *c-yes* erhöht sich schrittweise nach der Stimulierung.²³⁸

4.1.2 Phytohaemagglutinin (PHA)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Phytohaemagglutinin (PHA) als Mitogen gearbeitet. Bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurde PHA – ein Lektin der roten Kidney-Bohne (*Phaseolus vulgaris*) – aufgrund seiner haemagglutinierenden Fähigkeiten zur Agglomeration roter Blutzellen verwendet,²⁴⁹ im Jahr 1959 berichteten Hungerford *et al.* erstmals über mitogene Eigenschaften: Sie beschrieben *in vitro* kultivierte humane Lymphozyten aus dem peripheren Blut, die sich nach einer dreitägigen Behandlung mit PHA stark vergrößert hatten und zur Zellteilung fähig waren, d.h. die Zellen lagen vermehrt in der mitogenen Phase vor.^{252,253} Außerdem wurde nach einer 72-stündigen Inkubation dieser Zellen mit PHA ein Verklumpen festgestellt, PHA besitzt also *in vitro* zusätzlich zu den haemagglutinierenden auch leukozytenagglutinierende Eigenschaften.^{249,254} PHA lässt sich in Isolektine unterteilen, die jeweils als Tetramere aus zwei Untereinheiten (E = Erythrozyten-reaktiv und L = Lymphozyten-reaktiv) zusammengesetzt sind.²⁵⁵ Dabei ergibt sich eine Familie von fünf Isolektinen: L₄E₀, L₃E₁, L₂E₂, L₁E₃ und L₀E₄. PHA-L wird dabei als Lymphozyten-aktivierendes PHA bezeichnet, es besteht ausschließlich aus L₄E₀-Isolektin und vermittelt seine Wirkungen dabei nur auf Lymphozyten; die Kristallstruktur konnte 1996 aufgeklärt werden.²⁵⁶ Analog dazu besteht PHA-E (Erythrozyten-aktivierendes PHA) ausschließlich aus L₀E₄-Isolektin, es kann ausnahmslos Erythrozyten aktivieren.²⁵⁵ In dem wässrigen Extrakt, der aus der roten Kidney-Bohne gewonnen wird, liegt die sogenannte Proteinform (PHA-P) vor, eine Mischung aus allen fünf Isolektinen;²⁴⁹ zusätzlich ist die Mukoproteinform von PHA-P vorhanden (PHA-M),²⁴⁹ ein Konjugat aus Protein und Polysaccharid. PHA bindet an den TCR der T-Lymphozyten,²⁵⁷ genauer gesagt an die CD3⁺-Untereinheiten des Rezeptorkomplexes²⁵⁸ und aktiviert die Zellen auf diesem Wege.

4.1.3 Adenosin und T-Lymphozytenproliferation

Es ist seit längerem bekannt, dass Adenosin an der Regulation von Proliferation, Überleben und Apoptose vieler verschiedener Zelltypen wie z.B. Epithel-, Endothel- und glatter Muskelzellen wie auch Immunzellen und Zellen des Nervensystems beteiligt ist. Dabei scheinen vor allem A_{2A}- und A₃-Adenosinrezeptoren eine Rolle zu spielen,^{259,260} wobei für den A₃AR sowohl zellprotektive als auch zelltötende Effekte beschrieben wurden, abhängig von dem Grad der Rezeptoraktivierung. Die Rolle des A_{2A}AR scheint eindeutig, ihm wird eine spezifische Rolle bei der Unterdrückung und Abtötung von Immunzellen und damit eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen.^{259,260} Adenosin und analoge Adenosinrezeptor-Agonisten zeigen dabei einen Proliferations-hemmenden Effekt speziell auf Mitogen-stimulierte humane Lymphozyten.^{156,241,261} Durch eine Kombination mit dem ADA-Inhibitor **Coformycin**, der einen Abbau von Adenosin zu Inosin verhindert, potenziert sich der Proliferations-hemmende Effekt und ist schon bei wesentlich geringeren Adenosinkonzentrationen zu beobachten.^{156,262} Dabei konnten Snyder *et al.* zeigen, dass Adenosin in PHA-stimulierten Lymphozyten bei Konzentrationen kleiner als 5 µM hauptsächlich (durch die Adenosinkinase) phosphoryliert wird, bei Adenosinkonzentrationen größer als 5 µM ist die Desaminierung durch **ADA** (EC 3.5.4.4, desaminiert Adenosin und 2'-Desoxyadenosin zu Inosin bzw. 2'-Desoxyinosin) der bestimmende Metabolisierungsweg, bei unstimulierten Lymphozyten zeigte sich über alle getesteten Adenosinkonzentrationen hinweg hauptsächlich die Desaminierung.²⁶² Adenosindesaminase ist ein Enzym, das in den meisten Geweben exprimiert wird, mit den höchsten Expressions- und Aktivitätsraten in Organen, in denen auch verstärkt lymphoide Zellen vorhanden sind,^{263,264} wie zum Beispiel dem Thymus.²⁶⁵ **ADA** scheint für ein intaktes Immunsystem von essentieller Bedeutung zu sein, da Patienten mit einem angeborenen **ADA**-Defekt und daraus resultierend einem vollständigen Mangel des Enzyms das Krankheitsbild der schweren, kombinierten Immundefizienz (SCID) ausbilden.²⁶⁶ Dabei liegen erhöhte Konzentrationen der Substrate von **ADA** wie z.B. erhöhte Adenosin-, Desoxyadenosin-, Adenin-, Adeninnukleotid- und S-Adenosyl-Homocysteinspiegel im Körper vor, vor allem in Plasma, Urin, Lymphozyten und Erythrozyten.^{156,267} Die betroffenen Kinder zeigen Thymus-Hypoplasien, einen teilweisen bis vollständigen Funktionsverlust und Depletion von T- und B-Lymphozyten^{267,268} sowie Autoimmunität. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass sich die

Krankheit fast ausschließlich auf das Immunsystem konzentriert, andere Organe, Gewebe oder Zellen scheinen nicht beeinträchtigt zu sein.²⁶⁸ Die frühere Hypothese, nach der die **ADA**-Substrate eine direkt toxische Wirkung, z.B. durch die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase,²⁶⁹ auf Lymphozyten ausüben,²⁶⁷ wurde dank neuerer Erkenntnisse erweitert, die eine Adenosinrezeptor-vermittelte Wirkung auf die Immunzellen neben den direkt lymphotoxischen, Rezeptor-unabhängigen Effekten belegen.^{127,155,158,259,270} Auch Defekte weiterer Purin-metabolisierender Enzyme – wodurch erhöhte Nukleosidkonzentrationen vorliegen – scheinen bei einer Immundefizienz mitzuwirken; so konnte bereits 1975 gezeigt werden, dass ein Defekt der Nukleosidphosphorylase die T-Lymphozytenfunktion beeinträchtigt²⁷¹ und eine intakte Ecto-5'-Nukleotidase für eine normale B-Lymphozytentätigkeit essentiell ist.^{272,273} Adenosin spielt auch bei der T-Lymphozytenselektion im Thymus eine wichtige Rolle als physiologisches, Apoptose-vermittelndes Signal: Während der T-Zellontogenese im Thymus werden auf CD4⁺CD8⁻-Thymozyten der T-Zellrezeptor und beide Oberflächenmoleküle CD4⁺CD8⁺ exprimiert, auf Stromazellen des Thymusepithels werden die beiden MHC-Moleküle (MHC-I und -II) auf der Oberfläche präsentiert.¹ Die Thymozyten durchlaufen nun eine positive und eine negative Selektion: Erkennt ein Thymozyt mit seinem gerade erhaltenen TCR die MHC-Moleküle des Thymus nicht, ist sein TCR also nicht funktionstüchtig, wird sofort die Apoptose eingeleitet. Erkennt und bindet er an die thymischen MHC-Moleküle, ist diese Bindung allerdings zu stark und droht dadurch die Gefahr der Autoimmunität, wird ebenfalls die Apoptose der Zelle eingeleitet. Die überlebenden Zellen reifen und differenzieren danach zu CD4⁺CD8⁻ oder CD8⁺CD4⁻ T-Lymphozyten, so verlassen also nur T-Lymphozyten den Thymus, die MHC-Moleküle erkennen und eine bestimmte Affinität ihres TCR für diese Moleküle besitzen, sie sind entweder CD4⁺ oder CD8⁺. Der Hauptteil der Thymozyten überlebt diese Selektion nicht und wird – teilweise Adenosin-vermittelt – abgetötet. Durch diese Wirkung von Adenosin lässt sich die beschriebene Autoimmunität bei einem **ADA**-Defekt und der daraus resultierenden SCID erklären, die als ein Ungleichgewicht zwischen Immuneffektor- und immunregulatorischen Zellen beschrieben wurde.²⁷⁰

Humane Lymphozyten, die mit PHA stimuliert wurden, zeigten eine stark erhöhte **ADA**-Aktivität – diese Erhöhung der Aktivität konnte noch vor Beginn der mitogen-induzierten DNA-Synthese beobachtet werden.^{241,262} **ADA** stimuliert die Proliferation humaner Lymphozyten,²⁶¹ dabei kann das Enzym neben der Lokalisation im Zytoplasma

auch über Proteine an die Zellmembran als sogenanntes Ecto-**ADA** gebunden sein.^{269,274} Ein solches Bindeprotein ist z.B. die extrazelluläre Domäne von CD26 (Dipeptidyl-Peptidase IV). Die Expression von CD26 steigt nach der TCR-Aktivierung, weshalb Ecto-**ADA** nur in stimulierten Zellen nachgewiesen werden kann und dabei auch nur einen kleinen Teil der gesamten **ADA** einer Zelle ausmacht.²⁶⁹ CD26 ist ein T-Zell-Aktivierungsmolekül, das eine kostimulatorische Rolle in TCR-stimulierten Zellen spielt, für eine Signaltransduktion über CD26 wird eine Bindung an den zytoplasmatischen Teil des TCR- ξ benötigt.²⁷⁵ Die Bindung von **ADA** an CD26 geschieht unabhängig von der Dipeptidyl-Peptidase IV-Enzymaktivität und nur auf der Zelloberfläche.²⁷⁶ Da CD26 ein wichtiges Molekül für die T-Zell-Aktivierung darstellt, wurde für CD26-gebundenens Ecto-**ADA** ebenfalls eine direkte Beteiligung an der T-Zellaktivierung beschrieben,²⁷⁵ auch zeigen Zellen, die den CD26/**ADA**-Komplex auf der Oberfläche exprimieren, eine höhere Resistenz gegenüber den inhibitorischen Effekten von Adenosin. Weitere Bindeproteine für Ecto-**ADA** sind A₁- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren,^{277,278} wobei eine Bindung von **ADA** an die Rezeptoren die Affinität für Rezeptorliganden erhöht und die Signaltransduktion durch eine effektive Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein erleichtert.

ADA wirkt also einerseits über seine Enzymaktivität und der damit verbundenen Verringerung der Adenosinkonzentration stimulierend auf die T-Zellproliferation, andererseits hat **ADA** eine Enzym-unabhängige Funktion als kostimulatorisches Signal und verstärkt dadurch die Proliferation von T-Lymphozyten.

Auch Antagonisten an Adenosinrezeptoren, vor allem Methylxanthine wie z.B. **Theophyllin**, **Coffein** oder **Pentoxifyllin**, können Proliferations-stimulierende Effekte zeigen, es wurden jedoch vorwiegend hemmende Eigenschaften beschrieben.^{241,261,279-282} Dies ist abhängig von der eingesetzten Konzentration und den Versuchsbedingungen und nicht weiter verwunderlich, da es sich bei diesen Substanzen um unselektive Adenosinrezeptorantagonisten handelt, und somit – je nach blockiertem Subtyp – unterschiedliche Effekte (auf die Adenylatcyclase und daraus resultierend auf die cAMP-Konzentration) erzielt werden. Auch besitzt die Substanzklasse der Methylxanthine weitere biologische Effekte, wie z.B. eine Beeinflussung der 5'-Nukleotidase, der alkalischen Phosphatase, der dopaminergen Neurotransmission²⁸³ und in hohen Konzentrationen eine Hemmung der Phosphodiesterase (EC 3.1.4.17, ein Enzym, welches die

Hydrolyse von cAMP bzw. cGMP zu AMP bzw. GMP katalysiert),²⁸⁴ was wiederum ebenfalls einen Einfluss auf die herrschende, intrazelluläre cAMP-Konzentration hat. Somit sind die Wirkungen dieser Substanzklasse auf die Lymphozytenproliferation vielschichtig. Für Subtyp-selektive Adenosinrezeptor-Antagonisten konnten bislang keine gesicherten Daten über den Zusammenhang zwischen selektiver Rezeptorblockade und Lymphozytenproliferation beschrieben werden. Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass die Lymphozytenproliferation über ein Gleichgewicht zwischen endogenem Adenosin und **ADA** reguliert wird, welches die intrazelluläre cAMP-Konzentration über Adenosinrezeptoren kontrolliert.²⁶¹ Diese cAMP-Konzentrationen wirken dann unter anderem auf den bereits beschriebenen autokrinen IL-2-Mechanismus ein¹²⁷ und nehmen so wiederum Einfluss auf die Zellproliferation, dabei wirkt cAMP inhibitorisch auf die Lymphozyten-Proliferation.^{279,282,285,286}

Die Lymphozyten-Proliferation ist zusätzlich von weiteren Faktoren abhängig, so zum Beispiel ist eine Interaktion mit Monozyten bzw. eine Interaktion der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulation untereinander (B-Lymphozyten, CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten) essentiell. Dabei werden Antigene vorbereitet und präsentiert und für die Lymphozyten erst zugänglich gemacht, ebenfalls werden für die T-Zell-Mitogenese benötigte lösliche Faktoren wie Zytokine produziert und sezerniert. Alle diese Faktoren sind für eine vollständig ablaufende Proliferation unerlässlich, das Ganze stellt ein sehr komplexes, durch viele Faktoren im Gleichgewicht gehaltenes System dar. Zytokine und vor allem Interleukine, aber auch Botenstoffe wie Adenosin nehmen dabei eine Schlüsselrolle ein.

4.2 Einfluss von Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten

Auf Grundlage der beschriebenen Effekte von Adenosin und cAMP auf die Funktion und Proliferation von Lymphozyten sollte mit Hilfe von Proliferationsversuchen – beruhend auf der Basis des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in neu synthetisierte DNA während der Synthesephase des Zellzyklus – die genaue Rolle von Adenosinrezeptoren auf die Proliferation von T-Lymphozyten geklärt werden. Dabei sollte vor allem der Einfluss der einzelnen Adenosinrezeptorsubtypen genauer beleuchtet werden. Dies war lange Zeit ein Problem, da für einige Adenosinrezeptorsubtypen, vor allem für den A_{2B} -Adenosinrezeptor, keine selektiven und genügend affinen Liganden zur Verfügung standen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression aller vier Adenosinrezeptorsubtypen sowohl auf nativen humanen Lymphozyten als auch auf Jurkat T-Zellen nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 2**).

Für den hier beschriebenen Teil der Versuche wurde eine Zellsuspension von frisch isolierten, primären humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL) verwendet. Darin enthalten sind alle verschiedenen T-Lymphozyten-Subklassen und B-Lymphozyten. Die einzelnen Subpopulationen wurden nicht mehr weiter aufgereinigt/isoliert, da für eine vollständige Proliferationsreaktion die Zellen in vielschichtiger Weise miteinander in Wechselwirkungen treten müssen und einzelne Subklassen, die vollständig aufgereinigt und isoliert wurden, in Kultur nur eine sehr begrenzte Überlebenszeit zeigten, die gegenüber der „Mixkultur“ deutlich verringert ist und eine vollständige Proliferationsreaktion überhaupt nicht mehr möglich ist. Da die PBL-Zellsuspension aber zu mindestens 80% aus T-Lymphozyten besteht, kann davon ausgegangen werden, dass evtl. beobachtete Effekte T-Lymphozyten-vermittelt sind. Außerdem bindet PHA spezifisch an den T-Zell-Rezeptor und stimuliert dadurch die T-Lymphozytensubpopulation spezifisch, eine Inhibition der so induzierten Proliferation ist also eindeutig T-Lymphozyten-vermittelt.

4.2.1 Etablierung eines Assays im 96-Well-Format

Zuerst wurde versucht, den Assay im 96-Well-Format zu etablieren. Das verwendete Protokoll wurde mit Modifikationen aus den *Current Protocols in Immunology* übernommen.²⁵⁸ Dafür wurden verschiedene Zellzahlen, PHA-Konzentrationen, Endvolumina und Inkubationszeiten getestet, es zeigte sich jedoch, dass es nicht möglich war, den Assay unter den durch dieses Format vorgegebenen Bedingungen, wie einem maximalen Endvolumen von 200 µl und den im Labor vorhandenen Geräten (Harvester), zu etablieren. Limitierender Parameter war die Zellzahl/Zellkonzentration (Zellen/ml). Einerseits muss eine Mindestzellkonzentration eingesetzt werden, damit überhaupt eine Proliferation stattfindet und auch messbar wird,²⁵⁰ da die Zellen über sezernierte Moleküle wie Chemokine in ständigem Kontakt untereinander stehen. Bei einer zu geringen Zellkonzentration können die Zellen nicht miteinander kommunizieren und Effekte vermitteln, es findet keine/nur eine minimale Proliferation statt. Eine zu hohe Zellkonzentration wiederum ist einerseits für die Zellen unvorteilhaft, da in dem vorgegebenen geringen Volumen von maximal 200 µl zu wenig Medium eingesetzt wird, um alle Zellen über die Inkubationszeit ausreichend mit Nährstoffen versorgen zu können, andererseits wirken apoptotische und tote Zellen bzw. Zelltrümmer zusätzlich toxisch auf die noch verbleibenden, lebenden Zellen. Ein weiterer Aspekt war das Absaugen mit dem 96-Well-Harvester. Es zeigte sich, dass der Assay mit der benötigten Mindestzellzahl von eingesetzten 1×10^4 Zellen/Well nicht absaugbar war, sowohl die eingesetzten GF/B- als auch GF/C-Filter verstopften durch die Proteine der durch die Vakuumfiltration lysierten Zellen. Dadurch konnte die freie Radioaktivität nicht ausreichend von der in die DNA eingebauten Radioaktivität getrennt werden und der Assay war in diesem Format praktisch nicht durchführbar bzw. nicht auswertbar.

4.2.2 Etablierung eines Assays im 48-Vial-Format

Nachdem der Assay im 96-Well-Format nicht etabliert werden konnte, wurde versucht, die Experimente auf das 48-Vial-Format zu übertragen. Hierbei kommen sterile PE-Vials zum Einsatz, die bis zu einem maximalen Endvolumen von 2 ml befüllt werden können, außerdem werden diese Vials an einem Harvester abgesaugt, dessen Aufbau und auch die verwendeten Filterformate (\varnothing 2.0 cm im Gegensatz zu \varnothing 0.7 cm im 96er-Format) sich von dem des 96er-Formates unterscheiden. In ersten Vorversuchen wurden verschiedene Endvolumina (0.2 – 1 ml), Zellkonzentrationen (10^5 – 10^6 Zellen/Vial) und PHA-Konzentrationen (0.1 – 10 μ g/ml) getestet. Dabei konnten die Proben ohne Probleme über GF/B-Filter abgesaugt werden. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 2.5 Tage, um auf jeden Fall einen vollständigen Proliferationszyklus zu erfassen. Dabei zeigte sich in **Abb. 4-34** dargestelltes Bild.

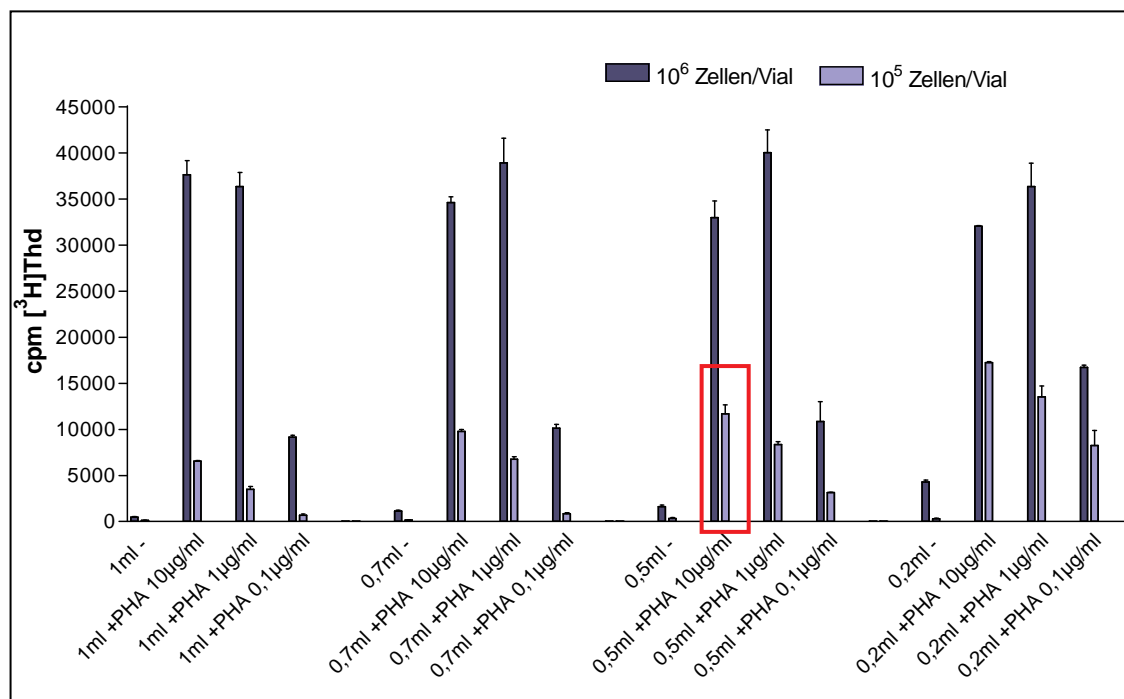


Abb. 4-34: Proliferation primärer humaner Lymphozyten ohne/mit Stimulation durch verschiedene Konzentrationen des Mitogens PHA. Dargestellt ist das jeweils in die DNA inkorporierte [3 H]Thymidin, $n=3 \pm$ SEM.

Mit einer eingesetzten Zellzahl von 10^6 Zellen (**Abb. 4-34**, dunkelblaue Balken) scheint man sich bereits bei einer PHA-Stimulation mit 1 μ g/ml bei allen getesteten Endvolumina am oberen Limit der Zellproliferation zu befinden. Dies wird dadurch sichtbar,

dass die inkorporierten [^3H]Thymidinmengen über alle getesteten Endvolumina und für eingesetzte 10 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ PHA gleich groß waren, bzw. von 1 $\mu\text{g/ml}$ auf 10 $\mu\text{g/ml}$ sogar eher eine Abnahme der Proliferation zu erkennen ist. Deshalb wurde für die weiteren Versuche eine einzusetzende Zellzahl von 10^5 Zellen/Vial (hellblaue Balken) ausgewählt. Bei dieser Zellzahl zeigte sich eine Dosis-abhängige Stimulation durch PHA, was darauf hindeutet, dass die Zellen ohne limitierende Faktoren proliferieren können und auch eine evtl. weitere/stärkere Stimulation der Zellen noch messbar ist. Bei eingesetzten 10 $\mu\text{g/ml}$ PHA ergibt sich ein jeweils ausreichend großes Messfenster um auch proliferationshemmende Effekte eindeutig erkennen zu können (342 ± 108 cpm unstimuliert im Vergleich zu 11704 ± 938 cpm stimuliert bei einem Endvolumen von 0.5 ml). Weiter ist zu sehen, dass bei einer Abnahme des Endvolumens die jeweiligen cpm steigen. Deshalb wurde ein Endvolumen von 0.5 ml festgelegt, da bei diesem Volumen die einzelnen zu pipettierenden Volumina, hauptsächlich das der Testsubstanzen (10 μl), noch ausreichend groß sind, um Pipettierungenauigkeiten und auch die DMSO-Endkonzentration zu reduzieren. Zusammengefasst wurden für weitere Versuche folgende Parameter ausgewählt:

Endvolumen: 0.5 ml,

Zellzahl: 1×10^5 Zellen/Vial, entspricht einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml,

PHA-Konzentration: 10 $\mu\text{g/ml}$,

Inkubationszeit: 48 h + 8 h mit [^3H]Thd (0.5 $\mu\text{Ci/Vial}$),

Filter: GF/B

Es wurden immer zwei parallele Ansätze angesetzt, in den einen wurden PBL ohne Zusatz des Mitogens PHA eingesetzt, wodurch vor allem ein Proliferations-stimulierender Effekt der Rezeptorliganden herausgestellt werden sollte. Da sich die Zellen nach der Isolierung per se in der G_0 -Phase des Zellzyklus befinden und deshalb ohne Kontakt zu einem Stimulans keine Zellteilungs-Aktivitäten zeigen, deutet eine hier beobachtete Inhibition der Proliferation auf einen Eingriff in die grundlegenden Zell-funktionen hin. In den anderen, analogen Ansatz wurden die PBL-Zellen in Kombination mit PHA eingesetzt und dadurch stimuliert. Diese Ansätze dienten vor allem der Untersuchung von evtl. Proliferations-inhibitorischen Effekten der Testsubstanzen.

In den Darstellungen der Versuche ist als 100% jeweils der Wert für die Proliferation der Zellen ohne Substanzzugabe gesetzt. Die statistische Auswertung und die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe eines Student's t-Test, wobei ns = nicht signifikant ($P > 0.05$); * = signifikant ($P < 0.05$); ** = sehr signifikant ($P < 0.01$) und *** = äußerst signifikant ($P < 0.001$) bedeutet.

4.2.3 Überprüfung der Assayetablierung durch FACS-Messungen

Die erfolgreiche Etablierung des Proliferationsassays mit primären humanen Lymphozyten im 48-Vial-Format wurde durch zusätzliche durchflusszytometrische Messungen an einem *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Gerät überprüft. Dabei wurde die Proliferation der Zellen mit Hilfe von CFSE gemessen, Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der passiv in das Zellinnere eindringt und dort irreversibel an Zellproteine bindet. Sobald unspezifische zelluläre Esterasen den Ester hydrolysieren, beginnt er zu fluoreszieren. Die so entstandene Fluoreszenz hält in ruhenden Zellen über Monate an und ihre Intensität halbiert sich bei jeder Zellteilung, da sie auf die entstehenden Tochterzellen verteilt wird. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität mit dem FACS-Gerät können deshalb Rückschlüsse darauf gezogen werden, wie viele Proliferationszyklen eine Zelle bereits durchlaufen hat. Für die Überprüfung wurden die Versuche analog zu den Versuchen im 48-Vial-Format mit den bestimmten Parametern angesetzt. Anstatt Radioaktivität wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen eingesetzt - sowohl unstimulierte Zellen als auch parallel dazu mit PHA stimulierten Zellen. Eine beispielhafte Auswertung der Messungen ist in **Abb. 3-35** dargestellt. In **Abb. 3-35 A** ist die Fluoreszenzintensität von CFSE in unstimulierten Zellen dargestellt, es ist ein klarer, einzelner Peak des Fluoreszenzfarbstoffes zu sehen. Die Zellen haben sich in den drei Tagen des Versuches nicht geteilt und müssen sich somit in der G_0 -Phase des Zellzyklus befinden. In **Abb. 3-35 B**, in der die über drei Tage mit PHA stimulierten Zellen dargestellt sind, sind mindestens zwei klar voneinander unterscheidbare Peaks zu erkennen, d.h. die Zellen haben mindestens einmal den Zellzyklus durchlaufen und sich geteilt. Auffällig ist, dass in der Messung der unstimulierten Zellen noch wesentlich mehr lebende Zellen gezählt werden konnten als in der Messung mit den stimulierten Zellen.

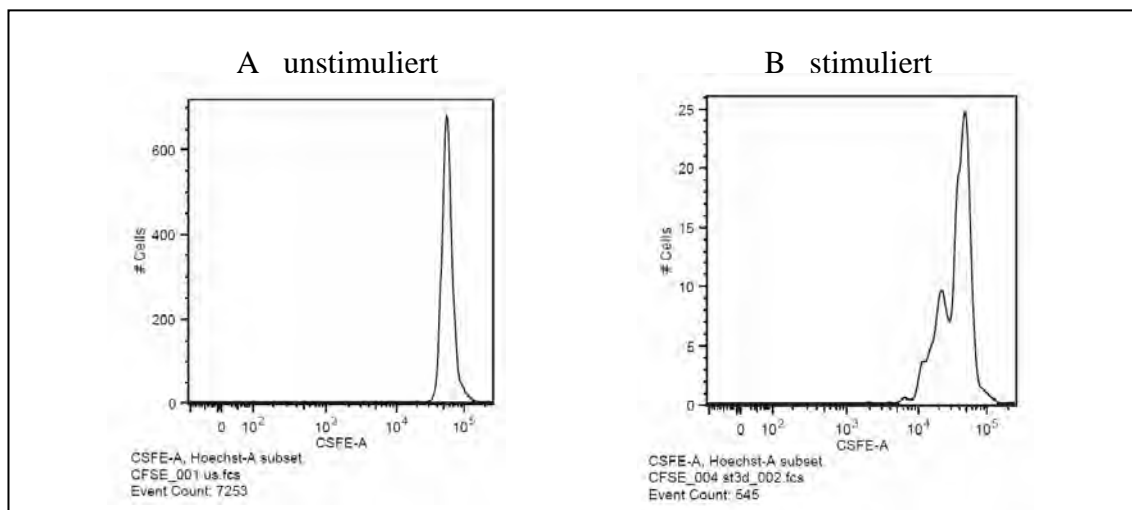


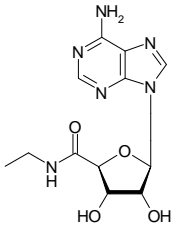
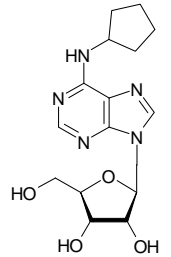
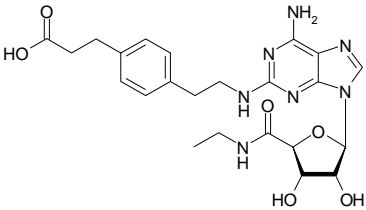
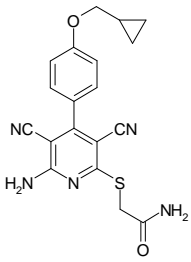
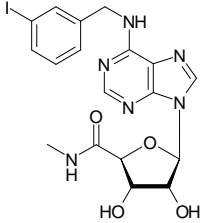
Abb. 3-35: Proliferation primärer humaner Lymphozyten **A** ohne **B** mit PHA-Stimulation. Dargestellt ist die CFSE-Intensität in lebenden Zellen (Hoechst-Anfärbung).

Winger *et al.* machten genau diese Beobachtungen, dass Zellpopulationen von humanen peripheren Blutlymphozyten ohne spezielle Behandlung, z.B. durch einen Feeder-Layer-Ansatz, nach PHA-Stimulation nur einen einzelnen Zellzyklus durchlaufen und danach absterben.²⁵⁰ Da ein Zellzyklus – wie oben beschrieben – jedoch meist ca. zwei Tage dauert, ist somit in einem 2.5 Tage dauernden Versuch sowieso nicht viel mehr als ein einzelner Zyklus abgedeckt. Ausserdem erwies sich die [³H]Thymidin-Inkorporation in einem Zellzyklus schon als ausreichend, um eventuelle Effekte auf die Zellproliferation zu erkennen und ein ausreichend großes Auswertefenster zwischen den cpm für unstimulierte Zellen und den cpm für PHA-stimulierte Zellen zu erreichen. Aus diesen Gründen ist diese Tatsache für die weiteren Proliferationsversuche dieser Arbeit vernachlässigbar.

4.2.4 Adenosinrezeptor-Agonisten

Wie in der Einleitung zu diesem Kapitel (Abschnitt 4.1.3) beschrieben, werden für Adenosin und analoge Adenosinrezeptor-Agonisten hemmende Effekte auf die Proliferation stimulierter humaner Lymphozyten beschrieben.

Tab. 4-13: Strukturen der untersuchten Adenosinrezeptoragonisten und Affinitäten an Adenosinrezeptor-subtypen

| Agonist | Struktur | Subtyp-selektivität | Affinitäten K _i in nM |
|------------|---|---------------------|---|
| NECA |  | unselektiv | hA ₁ : 14** hA _{2A} : 20 hA _{2B} : 330** hA ₃ : 6.2 ¹⁷⁹ |
| CPA |  | A ₁ AR | hA ₁ : 2.3** hA _{2A} : 790 hA _{2B} : >10000 (EC ₅₀) hA ₃ : 43 ¹⁸⁷ |
| CGS 21680 |  | A _{2A} AR | hA ₁ : 290** hA _{2A} : 27 hA _{2B} : >10000 hA ₃ : 67 ¹⁷⁹ |
| BAY60-6583 |  | A _{2B} AR | hA ₁ : >1000 hA _{2A} : >1000* hA _{2B} : 212 ^{178**} hA ₃ : n.d. |
| IB-MECA |  | A ₃ AR | hA ₁ : 3.7** hA _{2A} : 2500 hA _{2B} : 11000 (EC ₅₀) hA ₃ : 1.2 ⁷⁵ 0.19 ²⁸⁷ |

*unveröffentlichte Ergebnisse aus dem eigenen Arbeitskreis.

** Daten gegen Antagonist-Radioliganden, Affinität dadurch leicht verringert dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in **Tab. 4-13** dargestellten Adenosinrezeptoragonisten mit Subtypselektivität für die einzelnen Adenosinrezeptorsubtypen getestet.

Die Ergebnisse dieser Testsubstanzen auf unstimulierte und PHA-stimulierte primäre humane Lymphozyten sind in **Abb. 4-36** dargestellt.

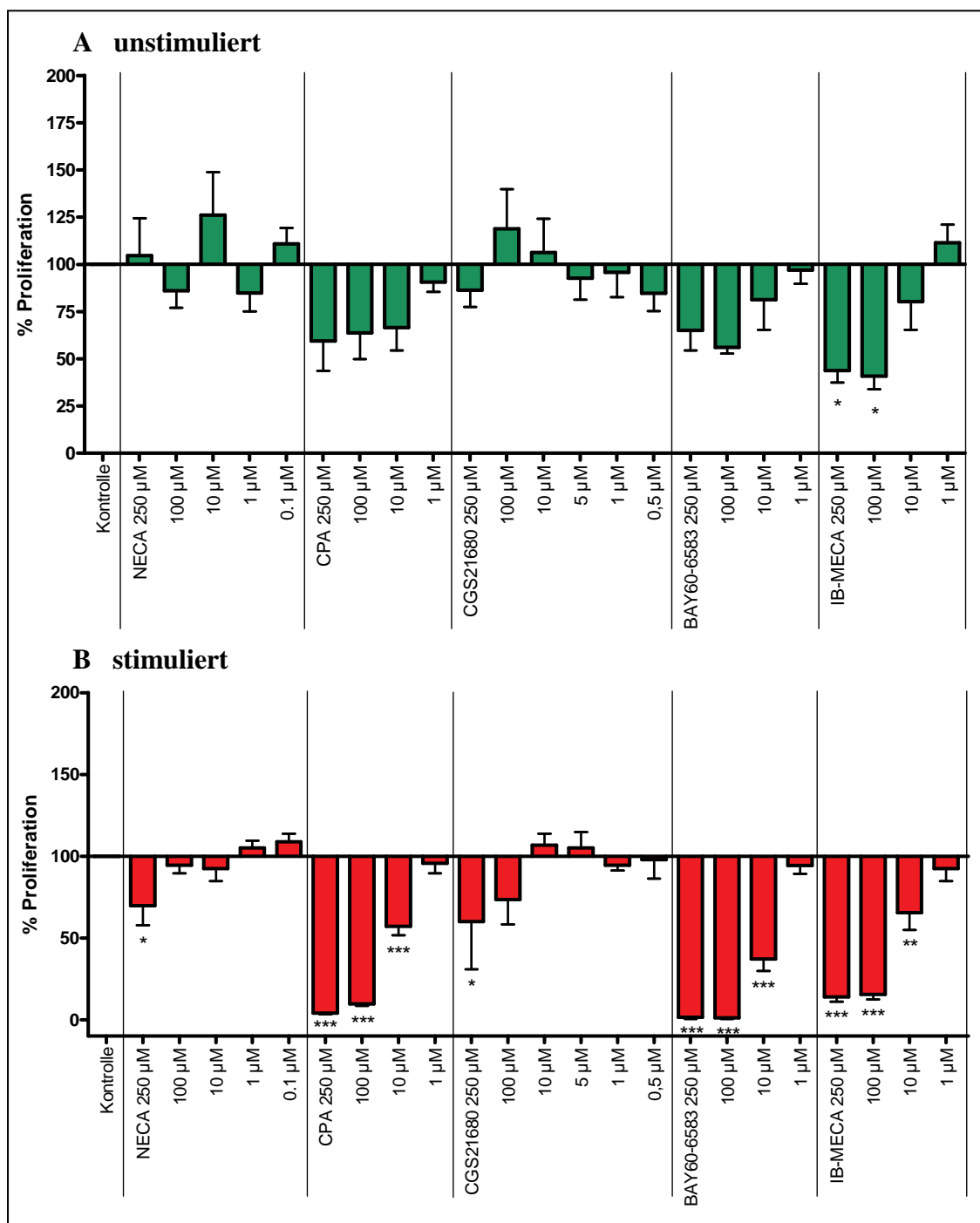


Abb. 4-36: Einfluss verschiedener Adenosinrezeptoragonisten auf die Proliferation **A.** unstimulierter **B.** PHA-stimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=3-11 \pm \text{SEM}$. Die Werte sind normalisiert auf den Wert der Kontrolle – Proliferation der Zellen (unstimuliert und PHA-stimuliert) ohne Zugabe von Testsubstanzen = 100% – dargestellt.

An unstimulierten Zellen zeigen der A_1 -selektive Agonist **CPA**, der A_{2B} -selektive Agonist **BAY60-6583** und der A_3 -selektive Agonist **IB-MECA** dosis-abhängig proliferationshemmende Tendenzen, bei **IB-MECA** ist diese Hemmung statistisch signifikant. Auffallend ist hierbei, dass die Effekte jeweils erst ab relativ hohen Konzentrationen im mikromolaren Bereich auftreten. Der Adenosinrezeptor-unselektive Agonist **NECA** und das A_{2A} -selektive **CGS 21680** haben keinen nennenswerten Einfluss auf die Proliferation unstimulierter humaner T-Lymphozyten, es sind nur sehr geringe – stimulatorische oder auch inhibitorische – Effekte zu erkennen, die allesamt statistisch nicht signifikant sind.

An PHA-stimulierten primären humanen T-Zellen bestätigen bzw. verstärken sich die Tendenzen aus den Versuchen an unstimulierten Zellen: **CPA**, **BAY60-6583** und **IB-MECA** zeigen statistisch hoch signifikante inhibitorische Effekte auf die Proliferation – auch hier allerdings erst ab hohen, mikromolaren Konzentrationen. **NECA** und **CGS 21680** scheinen keinen großen Einfluss auf die Proliferation auszuüben, erst ab der sehr hohen Konzentration von jeweils 250 μM deutet sich eine geringe, statistisch gerade signifikante Inhibition der Proliferation an.

Auf Grundlage dieser beobachteten Effekte von Adenosinrezeptoragonisten auf die Proliferation unstimulierter bzw. stimulierter primärer T-Lymphozyten wurden – wo möglich – Dosis-Wirkungskurven erstellt und daraus die IC_{50} -Werte berechnet, diese sind in **Abb. 4-37** dargestellt.

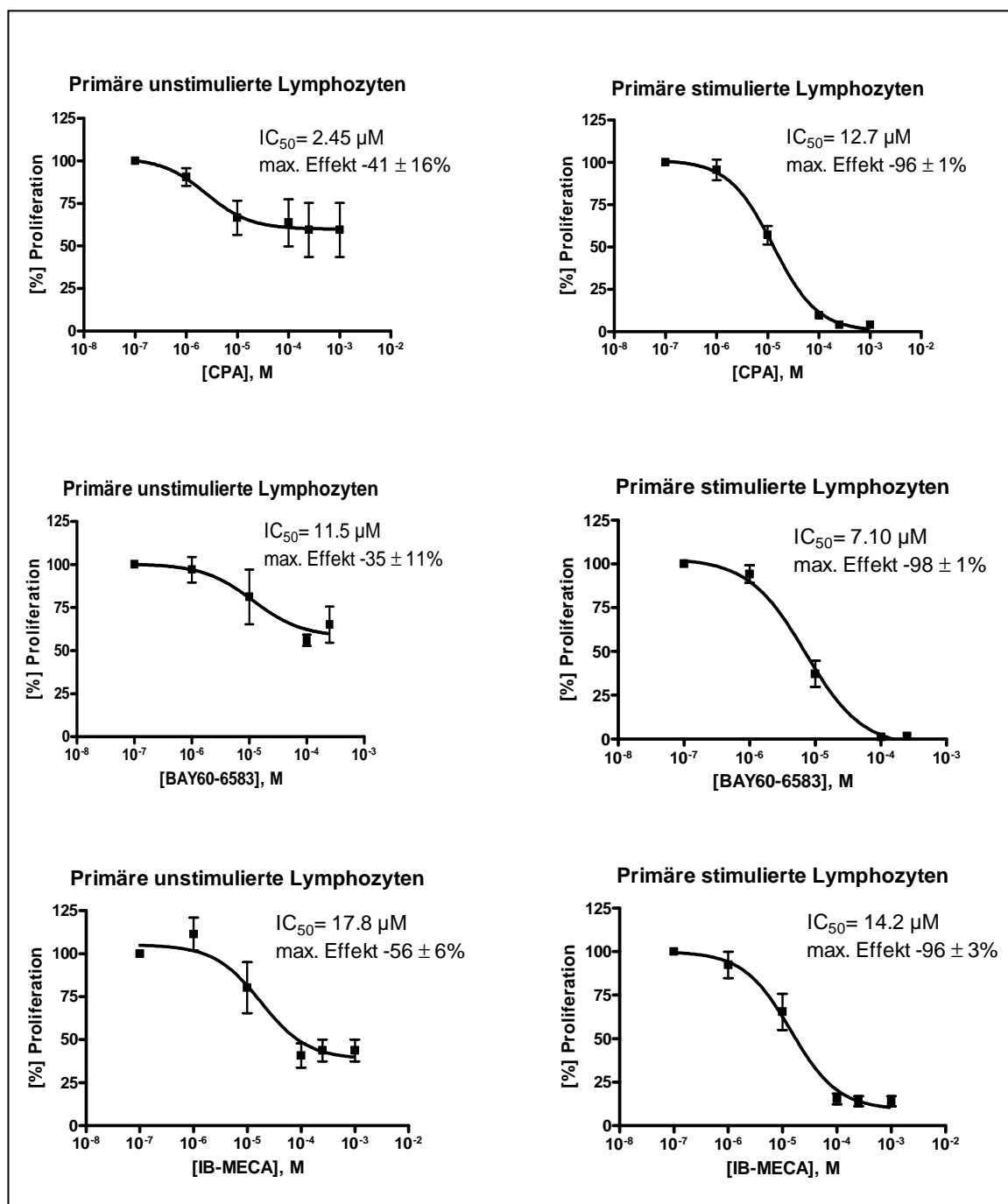


Abb. 4-37: Dosis-Wirkungskurven verschiedener Adenosinrezeptoragonisten. Effekte auf die Proliferation unstimulierter und PHA-stimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=3-11 \pm$ SEM. 100% Proliferation

4.2.5 Adenosinrezeptor-Antagonisten

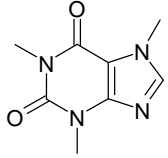
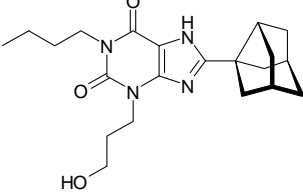
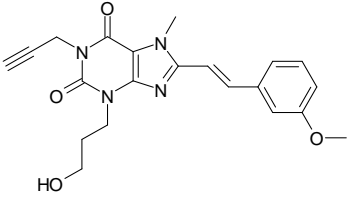
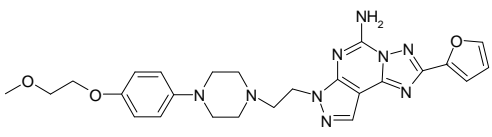
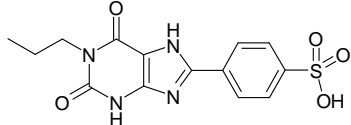
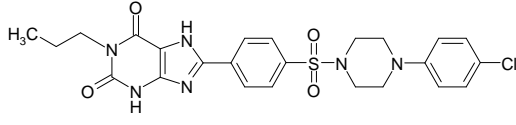
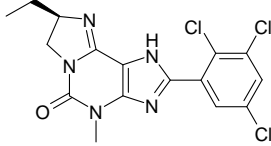
Nach den in **Kap. 4.2.4** beschriebenen, Proliferations-inhibitorischen Effekten für Adenosin und analoge Agonisten läge im Umkehrschluss die Vermutung nahe, dass – handelt es sich tatsächlich um einen Rezeptor-vermittelten Effekt – eine Behandlung mit (Subtyp-selektiven) Antagonisten zumindest für manche Subtypen eine Proliferations-stimulierende Wirkung auf Lymphozyten ausübt. Methylxanthine sind dabei aufgrund der in **Kap. 4.1.3** genannten, vielschichtigen Wirkungen differenzierter zu betrachten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in **Tab. 4-14** dargestellten Adenosinrezeptorantagonisten auf ihren Einfluss auf die T-Lymphozytenproliferation getestet. Die Ergebnisse dieser Testsubstanzen auf unstimulierte und PHA-stimulierte primäre humane Lymphozyten sind in **Abb. 4-38** dargestellt. Anders als nach den in **Kap. 4.2.4** gezeigten Ergebnissen (inhibierende Effekte der Adenosinrezeptoragonisten, v.a. A_1 , A_{2B} und A_3 , auf die Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten) zu erwarten war, zeigen die Subtyp-selektiven Antagonisten **PSB-36** (A_1), **MSX-2** (A_{2A}) und **PSB-10** (A_3) ebenfalls eine starke, dosisabhängige, statistisch hoch signifikante Inhibition der Proliferation von unstimulierten Zellen. Allerdings ist auch an dieser Versuchsreihe interessant, dass die Effekte erst bei relativ hohen Konzentrationen im mikromolaren Bereich auftreten. **Coffein** (unselektiv), **SCH-420814 (Preladenant)** (A_{2A}), **PSB-1115** (A_{2B}) und **PSB-603** (A_{2B}) scheinen dagegen auf die Proliferation dieser Zellen keinen Einfluss zu haben. Die Ergebnisse der Versuche an unstimulierten Zellen können auch hier durch Versuche an PHA-stimulierten Zellen bestätigt werden: **PSB-36**, **MSX-2** und **PSB-10** haben eindeutig antiproliferative Eigenschaften, die dosisabhängig sind und erst ab hohen, mikromolaren Konzentrationen auftreten. Zusätzlich zeigen auch **SCH-420814** und **PSB-603** jeweils bei einer Konzentration von 10 μM statistisch signifikante Hemmungen der Proliferation. **PSB-1115** hat wie auf die Proliferation unstimulierter Zellen auch auf die Proliferation stimulierter Zellen keinen Einfluss. Bei **Coffein** zeigt sich eine zusätzliche Stimulierung der Proliferation, jedoch nur bereits stimulierter Zellen, bei hohen Coffeinkonzentrationen von 250 μM und 100 μM . Dies ist auf den ersten Blick nicht weiter verwunderlich, da aufgrund der beschriebenen, inhibitorischen Wirkungen von Adenosin auf die Proliferation von T-Lymphozyten für einen unselektiven Antagonisten an Adenosinrezeptoren dieser Effekt als Folge der Adenosinrezeptorblockade zu erwarten

war. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch die in **Kapitel 4.2.7** dargestellten Ergebnisse für **ADA**, die ebenfalls eine Steigerung der Proliferation von T-Lymphozyten induziert. Verwunderlich ist jedoch, dass der stimulierende Effekt von **Coffein** auf die T-Lymphozyten-Proliferation nur in bereits stimulierten Zellen zu beobachten ist. Bei einem Adenosinrezeptor-vermittelten Effekt müsste man erwarten, dass dieser bereits in unstimulierten Zellen genauso – wenn nicht sogar in größerem Ausmaß – zu beobachten wäre, wie dies z.B. für **ADA** der Fall ist. Es gibt also durchaus Hinweise dafür, dass der beobachtete, stimulierende Effekt von **Coffein** auf die Proliferation bereits stimulierter T-Lymphozyten nicht (alleinig) Adenosinrezeptor-vermittelt ist, sondern (zusätzlich) weitere Mechanismen beteiligt sind. Das könnte mit den vielfältigen physiologischen Wirkungen der Methylxanthine erklärt werden, die für diese Substanzklasse neben ihrer Eigenschaft als Adenosinrezeptorantagonisten beschrieben wurden (siehe **Kap. 4.3.1**). Eine weitere interessante Tatsache ist an dieser Stelle, dass **Coffein** die erste Verbindung war, für die gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung der Zellen mit dem Methylxanthin eine Aufhebung der Zellzyklus-Kontrollpunkte zur Folge hat.²⁸⁸ Diese Punkte dienen als Kontrollstelle jeweils am Ende eines Abschnittes im Zellzyklus, ob dieser vollständig und ohne Schäden fertiggestellt wurde, danach wird die Progression des Zellzyklus reguliert. Aus diesem Grund stellen diese Kontrollpunkte Schnittstellen im Zellzyklus dar, an denen Zellzyklus-spezifische Apoptose eingeleitet werden kann. Werden diese Kontrollpunkte nun z.B. durch **Coffein** aufgehoben, so ist eine daraus resultierende, verstärkte Proliferation der Zellen nicht verwunderlich. Dies würde auch erklären, weshalb sich der Proliferations-stimulierende Effekt von **Coffein** nur bei stimulierten Lymphozyten manifestiert, da sich unstimulierte Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, keine mitotische Aktivität zeigen und deshalb nicht beeinflusst werden können.

Auch für die getesteten Adenosinrezeptorantagonisten wurden anhand der gemessenen Effekte auf die Proliferation unstimulierter bzw. stimulierter primärer T-Lymphozyten – wo dies möglich war – Dosis-Wirkungskurven erstellt und daraus die IC₅₀/EC₅₀-Werte berechnet, diese sind in **Abb. 4-39** dargestellt.

Tab. 4-14: Strukturen der untersuchten Adenosinrezeptorantagonisten und Affinitäten an Adenosinrezeptorsubtypen

| Antagonist | Strukturformel | Subtyp-selektivität | Affinitäten K_i in nM |
|-------------------------------------|---|---------------------|--|
| Coffein |  | unselektiv | hA ₁ : 44900 hA _{2A} : 23400 hA _{2B} : 20500 hA ₃ : >100000 ¹⁸¹ |
| PSB-36 |  | A ₁ AR | hA₁: 0.7 hA _{2A} : 980 hA _{2B} : 187 hA ₃ : 2300 ²⁸⁹ |
| MSX-2 |  | A _{2A} AR | hA ₁ : 2500 hA_{2A}: 5 hA _{2B} : >10000 hA ₃ : >10000 ²⁹⁰ |
| SCH-420814 (Preladenant) |  | A _{2A} AR | hA ₁ : >1000 hA_{2A}: 2.5 hA _{2B} : >1700 hA ₃ : >1000 ¹⁸² |
| PSB-1115 |  | A _{2B} AR | hA ₁ : 7400 hA _{2A} : 4700 hA_{2B}: 53.4 hA ₃ : 9200 ¹⁷⁹ |
| PSB-603 |  | A _{2B} AR | hA ₁ : >10000 hA _{2A} : >1000 hA_{2B}: 0.553 hA ₃ : >10000* |
| PSB-10 |  | A ₃ AR | hA ₁ : 1700 hA _{2A} : 2700 hA _{2B} : 30000 hA₃: 0.43 ¹⁷⁹ |

* unveröffentlichte Ergebnisse aus dem eigenen Arbeitskreis.

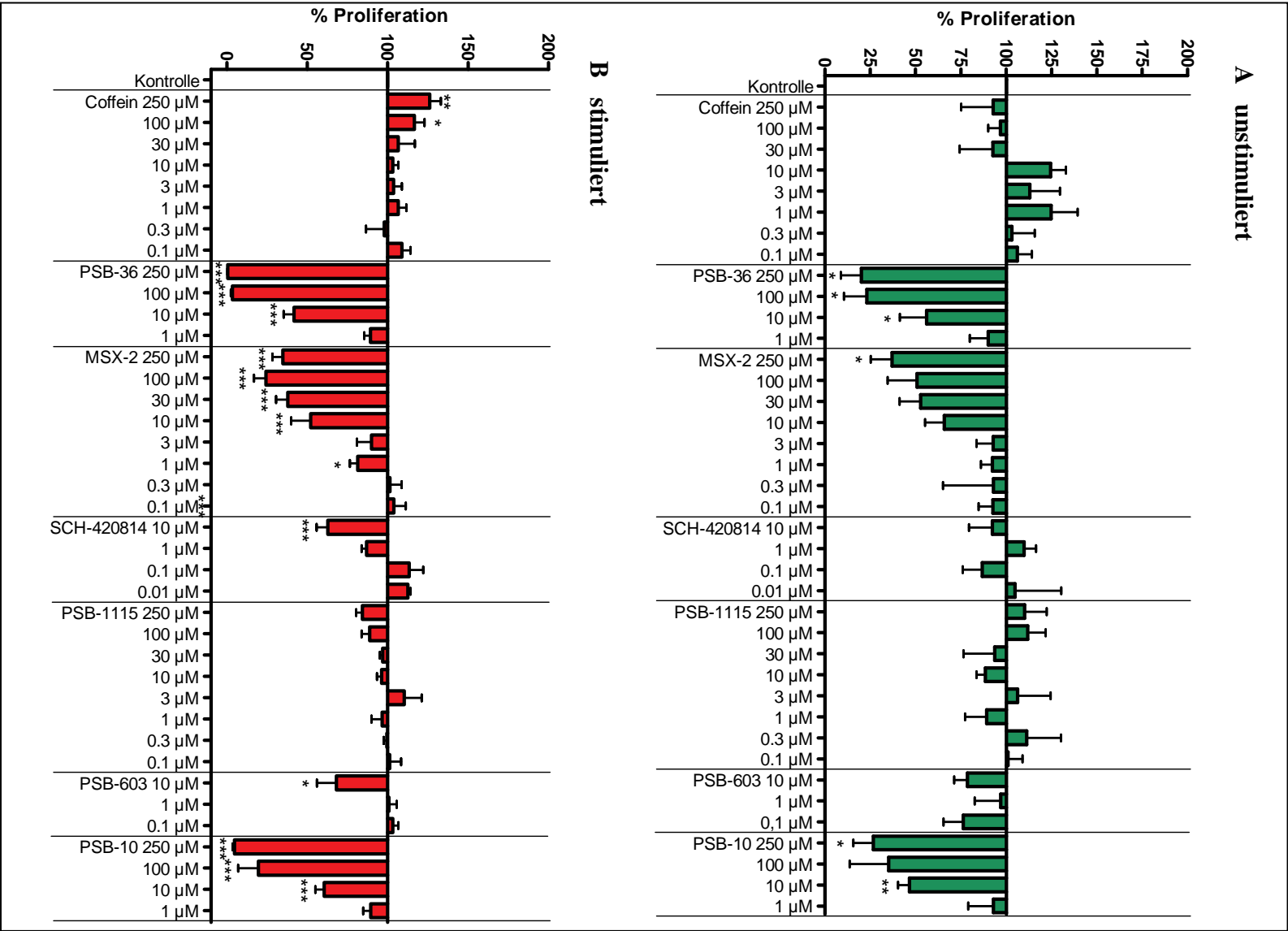


Abb. 4-38: Einfluss verschiedener Adenosinrezeptorantagonisten auf die Proliferation **A.** unstimulierter **B.** PHA-stimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=3-11 \pm \text{SEM}$. Die Werte sind normalisiert auf den Wert der Kontrolle – Proliferation der Zellen (unstimuliert und PHA-stimuliert) ohne Zugabe von Testsubstanzen = 100% – dargestellt.

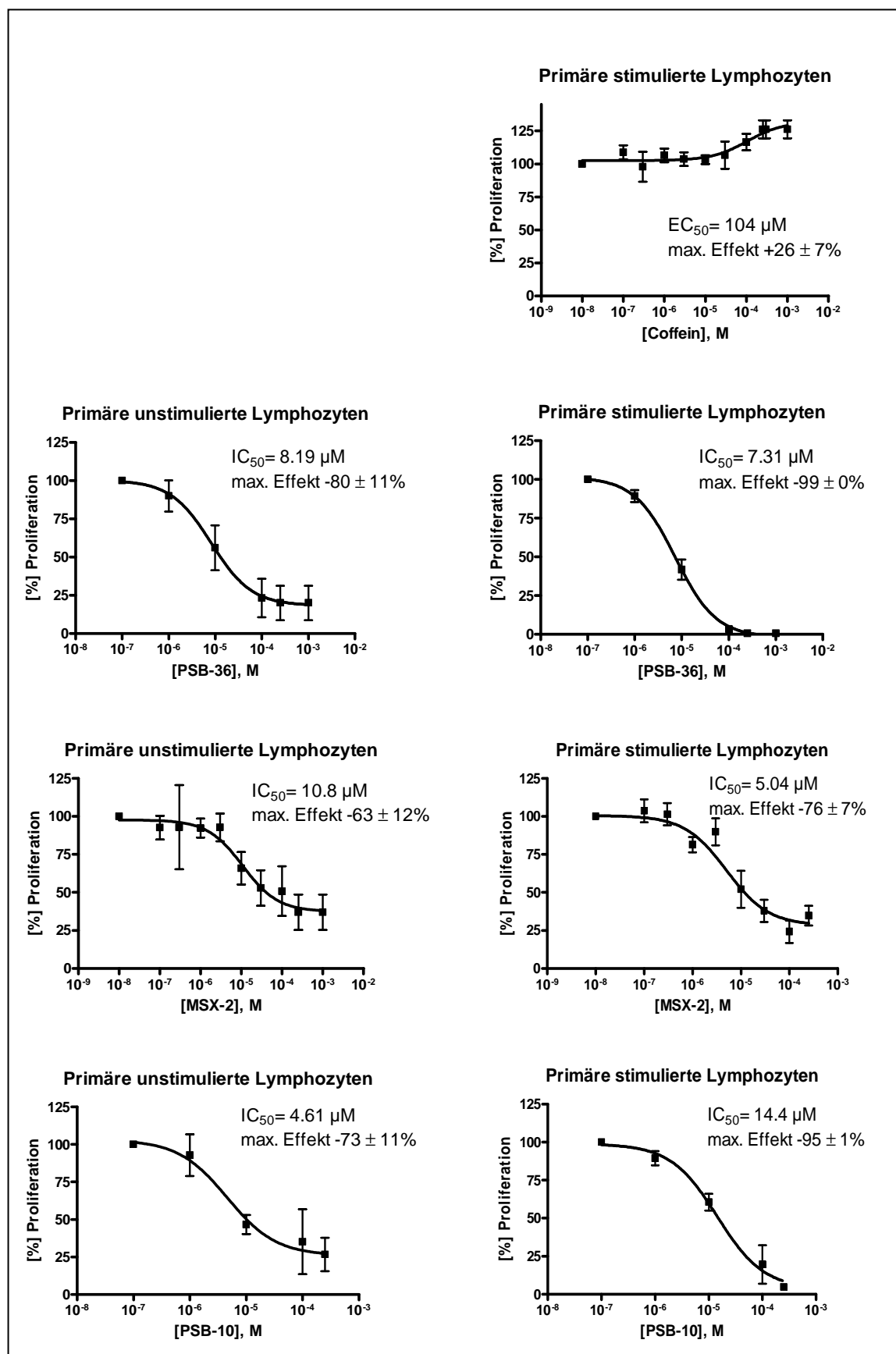


Abb. 4-39: Dosis-Wirkungskurven verschiedener Adenosinrezeptorantagonisten. Effekte auf die Proliferation unstimulierter und PHA-stimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=3-11 \pm$ SEM.

4.2.6 Weiterführende Untersuchungen zu den Effekten der Adenosinrezeptorliganden

Fasst man die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Ergebnisse der Wirkungen von Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten zusammen, so lässt sich feststellen, dass sowohl Adenosinrezeptoragonisten – hier vor allem das A₁-selektive **CPA**, das A_{2B}-selektive **BAY60-6583** und das A₃-selektive **IB-MECA** – wie erstaunlicherweise ebenfalls Adenosinrezeptorantagonisten – vor allem **PSB-36** (A₁), **MSX-2** (A_{2A}) und **PSB-10** (A₃), mit Ausnahme des unselektiven **Coffeins** – inhibierend auf die Proliferation der Zellen wirken. Festzuhalten ist auch, dass alle Effekte erst ab relativ hohen Konzentrationen im mikromolaren Bereich auftreten, was aufgrund der wesentlich höheren Affinitäten der Substanzen zum jeweiligen Adenosinrezeptor-Subtyp, für den sie selektiv sind (K_i-Werte meist im nanomolaren Bereich), einige Fragen aufwirft. Zur Klärung der auftretenden Unklarheiten gibt es mehrere Ansätze:

Eine Möglichkeit ist, dass die beobachteten Effekte tatsächlich Adenosinrezeptorvermittelt sind und dabei Agonisten wie erwartet, aber erstaunlicherweise auch Antagonisten inhibierend auf die Proliferation von primären humanen Lymphozyten wirken.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der überraschenderweise inhibierenden Effekte der Adenosinrezeptorantagonisten auf die Proliferation der Lymphozyten ist, dass diese initiale Blockade zu einer Hochregulation der Rezeptorexpression führt. Dadurch stehen nach kurzer Zeit wieder „freie“ Rezeptoren zur Verfügung, die dann durch das endogen vorhandene Adenosin aktiviert werden können. Der beobachtete inhibitorische Effekt würde nach dieser Theorie also einen Adenosin-vermittelten Effekt darstellen. Der beobachtete, stimulierende Effekt von **Coffein** könnte dabei – wie in **Kap. 4.2.5** postuliert – andere, Adenosinrezeptor-unabhängige Ursachen haben.

Eine dritte Möglichkeit zur Klärung der beobachteten Effekte ist, dass diese keine Rezeptor-vermittelten Effekte darstellen, sondern die eingesetzten Substanzen Rezeptor-unabhängig zytotoxisch auf die Zellen wirken und diese deshalb mit einer verminderten Proliferation auf die Zugabe der Substanzen reagieren bzw. sogar in ihren Grundfunktionen gestört werden und absterben.

Um erste Anhaltspunkte zur Klärung dieser Fragen zu erhalten, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: Es wurden die Antagonisten **PSB-36** (A_1), **MSX-2** (A_{2A}), **PSB-1115** (A_{2B}) und **PSB-10** (A_3) jeweils in einer Konzentration von 10 μ M folgendermaßen eingesetzt (der Versuch dauerte insgesamt 2.5 Tage):

1. Die Antagonistzugabe erfolgte einmalig zu Beginn des Versuches.
2. Die Antagonisten wurden jeweils mehrmals während des Versuches (3x) zugesetzt, um ihre ständige Präsenz zu gewährleisten.
3. Eine einmalige Antagonistzugabe wurde mit der einmaligen Zugabe von 1 I.U. ADA kombiniert, um evtl. vorhandenes endogen ausgeschüttetes Adenosin zu entfernen.
4. Eine einmalige Antagonistzugabe wurde mit der täglichen Zugabe von 1 I.U. ADA kombiniert, um eine zeitnahe Elimination von Adenosin zu gewährleisten und sicher zu gehen, dass die zugesetzte ADA-Aktivität ausreichend und nicht während des Versuches ausgeschöpft ist.
5. Sowohl die Antagonisten als auch ADA werden täglich zugegeben, um die doppelte Sicherheit zu haben, dass die Rezeptoren dauernd von Antagonisten blockiert werden und gleichzeitig evtl. ausgeschüttetes Adenosin sofort abgebaut werden kann, ein Agonisteffekt durch Adenosin also praktisch unmöglich gemacht wird.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in **Abb. 4-40** dargestellt. Obwohl u.a. für **CPA**, **R-PIA** und **NECA** bereits eine Rezeptor-vermittelte Inhibition der Proliferation von Lymphozyten gezeigt werden konnte,²⁹¹ ist es relativ unwahrscheinlich, dass es sich bei den hier beobachteten Effekten um direkt Adenosinrezeptor-vermittelte Hemmungen der Proliferation handelt. Dies wird vor allem durch zwei Beobachtungen deutlich: Es werden durch die Substanzzugabe sowohl unstimulierte als auch PHA-stimulierte Zellen in ungefähr demselben Ausmaß in ihrer Proliferation beeinträchtigt. Wie in der Einleitung zu diesem Kapitel beschrieben, deutet eine Verringerung des [3 H]Thymidineinbaus in unstimulierte Zellen auf Rezeptor-unabhängige, zytotoxische Effekte und damit verbundene Eingriffe in die Grundfunktion der Zellen hin.

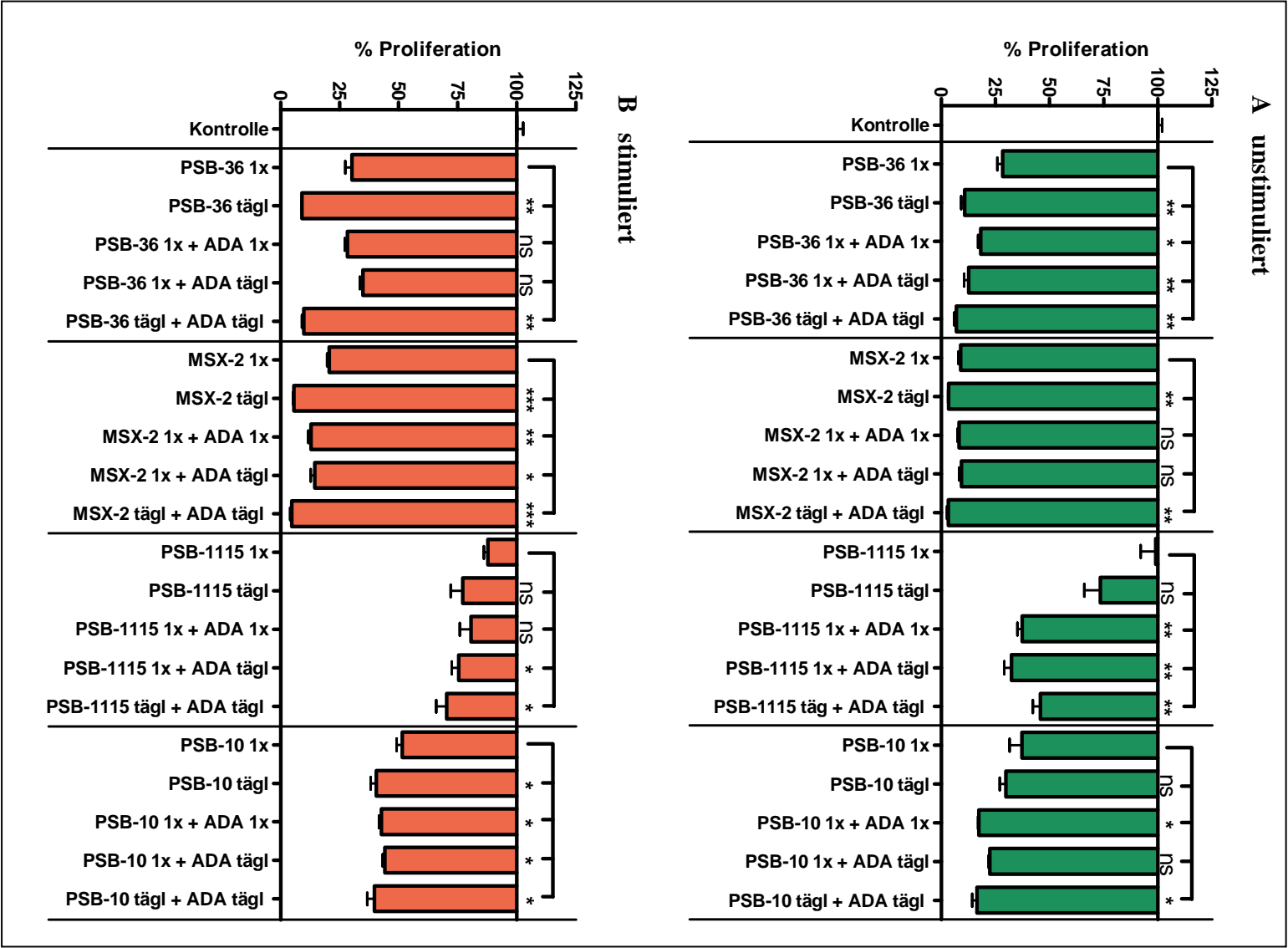


Abb. 4-40: Einfluss verschiedener Adenosinrezeptorantagonisten (10 μ M) in Kombination mit ADA (1 I.U.) auf die Proliferation **A.** unstimulierter **B.** PHA-stimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=2 \pm$ SEM.

Die Zellen befinden sich normalerweise nach der Isolation in der G₀-Phase des Zellzyklus und zeigen dabei keinerlei Proliferationsaktivitäten, die gehemmt werden könnten. Weiterhin treten die Effekte erst ab relativ hohen Konzentrationen im µM-Bereich auf. Die Affinitäten (K_i-Werte) der getesteten Antagonisten für den jeweiligen Adenosinrezeptorsubtyp liegen jedoch im nM-Bereich, sodass evtl. Rezeptor-vermittelte Effekte schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen zu erwarten wären.

Durch die einmalige Zugabe der Antagonisten konnten die bereits beobachteten inhibierenden Effekte von **PSB-36**, **MSX-2** und **PSB-10** reproduziert werden, durch wiederholte Zugabe der Substanzen wurden die hemmenden Effekte auf die Zellproliferation sogar ausnahmslos noch verstärkt. Auch die Kombination der Antagonisten mit ADA – egal ob einmalige oder mehrfache Zugabe – hatte entweder keinen Effekt oder verstärkte die Hemmung der Proliferation sogar noch im Vergleich zur einmaligen, alleinigen Substanzzugabe. Somit kann die These, dass die Antagonisteffekte eigentlich Adenosin-induzierte Agonisteffekte darstellen, als widerlegt angesehen werden.

Durch die zeitgleiche, gemeinsame Zugabe von Agonisten und entsprechenden Antagonisten (**PSB-36** + **CPA**, **MSX-2** + **CGS 21680**, **BAY60-6583** + **PSB-1115**, **IB-MECA** + **PSB-10**, Konzentrationen jeweils 10 µM) zeigte sich, dass sich die jeweiligen Liganden durch ihre entgegengesetzten Bindungseigenschaften nicht gegenseitig beeinflussen/stören und dadurch ihre Wirkungen nicht abgeschwächt wurden (wie es für Rezeptor-vermittelte Effekte zu erwarten gewesen wäre), sondern es zeigte sich, dass die Proliferations-hemmenden Effekte durch die gemeinsame Zugabe von Agonisten und Antagonisten sogar eher noch verstärkt wurden, was wiederum stark auf einen Rezeptor-unabhängigen Effekt der Substanzen hindeutet.

Die gezeigten Ergebnisse deuten alle sehr stark darauf hin, dass es sich um Rezeptor-unabhängige, zytotoxische Wirkungen auf die Zellen handelt. Adenosinrezeptorliganden wurden in der Vergangenheit schon mehrfach Rezeptor-unabhängige, zytotoxische Eigenschaften bzw. ein dualer Wirkmechanismus, der in der Apoptose der Zellen mündet, attestiert. Dabei ist einerseits die spezifische Aktivierung extrazellulärer Adenosinrezeptoren beteiligt, wodurch erhöhte intrazelluläre Konzentrationen der second messenger cAMP und Ca²⁺ vorliegen, die verantwortlich für die Aktivierung apoptotischer Vorgänge gemacht werden.²⁹² Andererseits werden die Adenosinrezeptorliganden

in den Intrazellulärraum transportiert und können dort intrazelluläre Abläufe, die an apoptotischen Prozessen beteiligt sind, direkt aktivieren.^{270,293} So wurden z.B. für **Adenosin**,²⁷⁰ **CADO** und **Cladribine** (2-Chlor-2'-deoxyadenosin),²⁹³ **DPCPX**²⁹² und **IB-MECA**²⁹⁴ teilweise oder vollständig Rezeptor-unabhängige Mechanismen zur Vermittlung von Apoptose in T-Lymphozyten bzw. Leukämiezellen beschrieben. Die Mechanismen der Apoptose, dem programmierten Zelltod, variiert von Zellsystem zu Zellsystem. In den meisten Fällen jedoch folgt die Apoptose auf einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und zeigt sich durch die Aktivierung der endogenen Nuklease, was eine DNA-Fragmentierung nach sich zieht.²⁹² Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle in der Apoptose-Entwicklung.²⁹³ Zell-Apoptose kann durch ein hochauflösendes Mikroskop beobachtet werden, apoptotische Zellen zeichnen sich dabei durch kondensiertes und verdichtetes Chromatin im Zellkern aus.²⁹⁵ Für **CADO** wurde berichtet, dass es in die DNA inkorporiert wird, dadurch die Tochterstrang-Synthese verhindert und daraufhin die Apoptose der Zelle eingeleitet wird. Im Falle von **DPCPX** wird beschrieben, dass es Apoptose durch die Inhibition der Phosphodiesterase (PDE) und dadurch erhöhte cAMP-Konzentrationen einleitet, die IC_{50} -Werte von **DPCPX** an den verschiedenen PDE-Isoenzymen liegen zwischen 9.33 – 851 μM .²⁸⁴

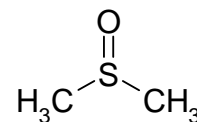
Auffällig an den ermittelten Proliferations-hemmenden Effekten – für Agonisten ebenso wie für Antagonisten – sind die Unterschiede in den maximalen Effekten zwischen unstimulierten und PHA-stimulierten Zellen, siehe **Abb. 4-37** und **4-39**. Dabei konnte für nahezu alle untersuchten Substanzen die überhaupt einen Effekt zeigen, an unstimulierten Zellen nur eine partielle Inhibition der Zellproliferation beobachtet werden, wohingegen die Proliferation von PHA-stimulierten humanen T-Lymphozyten in den meisten Fällen nahezu vollständig (90%) inhibiert werden konnte. Dies ist in Teilen darauf zurückzuführen, dass die cpm in den Versuchen mit unstimulierten Zellen mit einem Wert von maximal 500 cpm nur ca. 5% der maximalen cpm von ca. 10000 gemessen in Versuchen mit PHA-stimulierten Zellen betragen. Dadurch ergibt sich für Versuche mit unstimulierten Zellen ein wesentlich kleineres Auswertefenster und deutlich größere Standardfehler, wie sie bei den maximalen Effekten für unstimulierte Zellen im Vergleich zu Mitogen-stimulierten T-Lymphozyten auch zu beobachten waren. Dadurch lassen sich die Unterschiede aber nur zum Teil erklären, man könnte jedoch auch hier einen weiteren Hinweis auf Adenosinrezeptor-unabhängige, zytotoxische Effekte der untersuchten Testsubstanzen diskutieren. In der Literatur wird beschrieben,

dass die Zellen – native Lymphozyten sowie Jurkat T-Zellen – die Apoptose abhängig von der Art des Apoptosesignals in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus einleiten.²⁸⁸ Unstimulierte Zellen zeigten auch in diesen Studien nur eine sehr begrenzte Resonanz auf Apoptosesignale aufgrund des ruhenden Zustandes in der G₀-Phase des Zellzyklus.²⁸⁸ Eine weitere wichtige Beobachtung für diese These ist, dass die Effekte nicht nur für Adenosinrezeptorliganden, sondern ebenfalls für das seit langem als zytotoxisch bekannte **DMSO** gemessen werden konnten, siehe **Abb. 4-43**. Es scheint also tatsächlich so zu sein, dass sich die zytotoxischen Effekte verstärkt bei mitotisch aktiven Zellen manifestieren, dies könnte auf einen zytotoxischen Effekt aufgrund eines Eingriffes in den Zellzyklus zum Beispiel über eine Interaktion mit der DNA und der dadurch bedingten Einleitung der Apoptose – wie es z.B. für **CADO** beschrieben wurde – hindeuten.

4.2.7 Die Adenosindesaminase (ADA)

Die Adenosindesaminase (**ADA**) ist ein Enzym, das Adenosin bzw. 2'-Desoxyadenosin zu Inosin bzw. 2'-Desoxyinosin abbaut. Daher geht eine erhöhte ADA-Aktivität mit einer Abnahme der lokal herrschenden Adenosinkonzentration einher. 1 I.U. **ADA** ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die bei konstanten Bedingungen von 25°C und pH 7.5 pro Minute 1 µmol Adenosin zu Inosin desaminiert. In Übereinstimmung mit den berichteten inhibitorischen Effekten von Adenosin bzw. Agonisten an Adenosinrezeptoren sowie den stimulierenden Effekten von Adenosinrezeptor-Antagonisten wurden für **ADA** ebenfalls stimulierende Effekte auf die Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten beschrieben.²⁶¹ Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb diese Effekte von **ADA** reproduziert werden. Parallel dazu wurden die verschiedenen Konzentrationen des Enzyms für 5 min bei 99°C hitzeinaktiviert und getestet, dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass beobachtete Effekte durch das Lösungsmittel Glycerin/KH₂PO₄ vermittelt werden. Bei einer eingesetzten **ADA**-Aktivität von 10 I.U. wird über das Lösungsmittel immerhin eine Glycerinendkonzentration von 60 mM im Ansatz erreicht.

Dimethylsulfoxid (**DMSO**) ist ein organisches, aprotisches, dipolares Lösungsmittel, das aufgrund seiner guten Lösungs- und physikochemischen Eigenschaften weit verbreitet zur Verbesserung der Löslichkeit vieler Testsubstanzen eingesetzt



DMSO

wird. Gerade in der Wirkstoffforschung weisen viele neu entwickelte Substanzen lipophile Eigenschaften und damit eine nur sehr begrenzte Löslichkeit in hydrophilem Milieu auf. Außerdem wird **DMSO** in der Zellkultur bei der Kryokonservierung von Zellen als Gefrierschutzmittel eingesetzt. Konzentriertes **DMSO** besitzt jedoch zytotoxische Wirkungen, es interagiert mit dem Metabolismus und der Membran von Zellen, was zu einer schweren Schädigung der Zelle führt.²⁹⁶ Die jeweilige Toleranz der Zellen gegenüber dieser Toxizität ist von Zelllinie zu Zelllinie verschieden, manche Zellen scheinen eine **DMSO**-Konzentration von bis zu 10% zu tolerieren.²⁹⁶ Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die Toxizität von **DMSO** auf primäre humane T-Lymphozyten untersucht werden.

Die Ergebnisse der Effekte von ADA und **DMSO** auf die Proliferation von unstimulierten und PHA-stimulierten primären humanen Lymphozyten sind in **Abb. 4-41** dargestellt.

ADA wirkt auf die Proliferation unstimulierter primärer humaner T-Lymphozyten eindeutig stimulierend. Die Effekte treten im Konzentrationsbereich zwischen 0.03 I.U. und 1 I.U. ADA auf und erhöhen die Zellzahl um ca. 50%. Bei höheren ADA-Konzentrationen ab 3 I.U. nehmen die Effekte wieder ab und befinden sich auf Hintergrundniveau. Diese Ergebnisse sind in sehr guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Effekten von ADA.²⁶¹ An bereits stimulierten Zellen zeigt ADA erwartungsgemäß keinerlei weitere Effekte auf die Proliferation. Die Versuche mit den hitzeinaktivierten Proben des Enzyms beweisen, dass das Lösungsmittel Glycerin/KH₂PO₄, in dem ADA gelöst vorliegt, weder auf unstimulierte noch auf stimulierte Zellen einen Einfluss hat und die beobachteten Effekte tatsächlich ADA-vermittelt sind. Die aus den Ergebnissen erstellte Dosis-Wirkungskurve lieferte einen EC₅₀-Wert für ADA von 0.093 I.U., siehe **Abb. 4-42**.

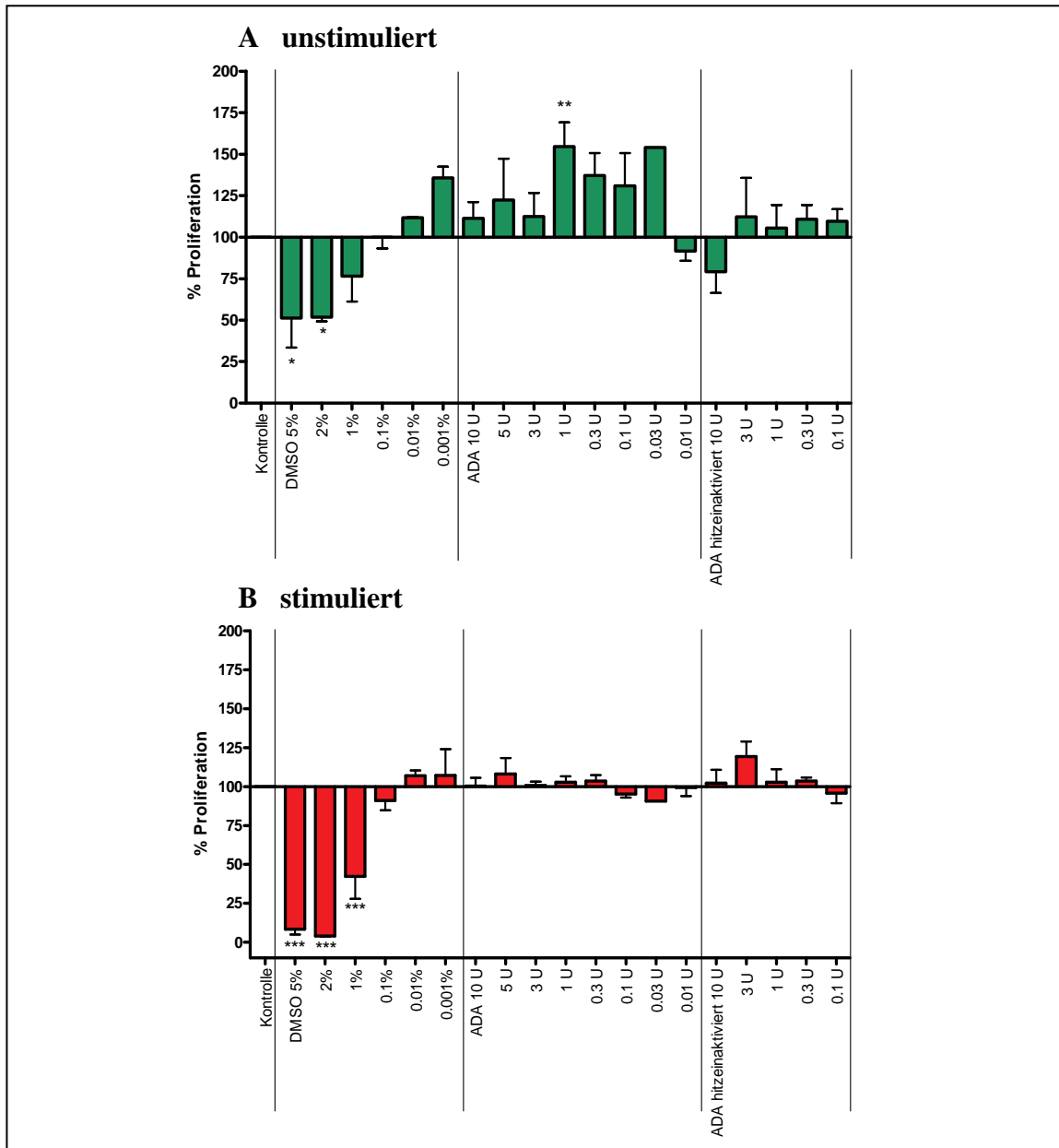


Abb. 4-41: Einfluss von ADA und DMSO auf die Proliferation **A.** unstimulierter **B.** PHA-stimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=3-11 \pm \text{SEM}$. Die Werte sind normalisiert auf den Wert der Kontrolle – Proliferation der Zellen (unstimuliert und PHA-stimuliert) ohne Zugabe von Testsubstanzen = 100% – dargestellt.

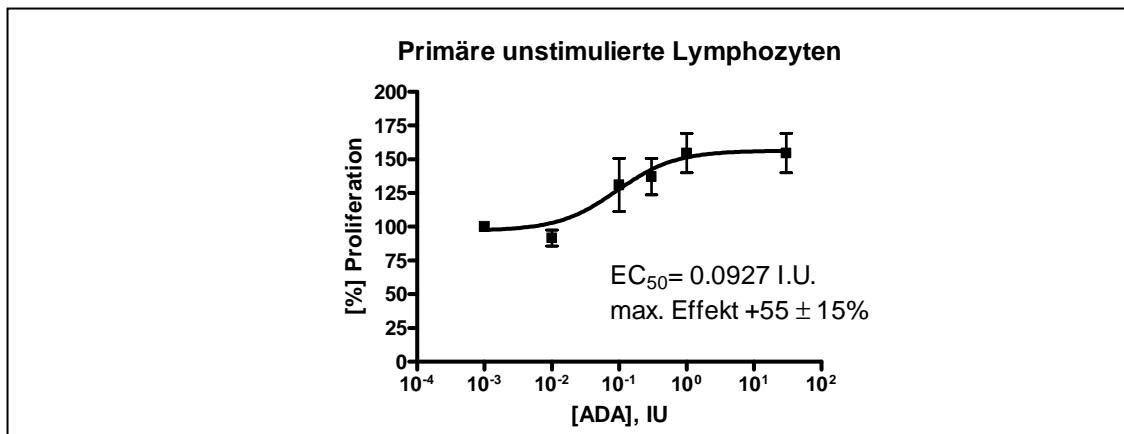


Abb. 4-42: Dosis-Wirkungskurve von ADA. Effekt auf die Proliferation unstimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Die Tatsache, dass **ADA** eine klar stimulierende Wirkung auf die Proliferation von primären humanen T-Lymphozyten ausübt, lässt im Umkehrschluss die Aussage zu, dass Adenosin eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation dieser Zellen ausüben muss. Durch eine Erniedrigung der Adenosinkonzentration durch das Enzym **ADA** fällt dieser inhibitorische Stimulus weg und die Zellen können in verstärktem Maße aktiviert werden und proliferieren. Dadurch untermauern diese Ergebnisse die These, dass Adenosin über T-Lymphozyten immunsuppressiv wirkt. Eine verstärkte Adenosinausschüttung, wie es unter pathophysiologischen Zuständen wie z.B. einer Entzündung und der dadurch bedingten Hypoxie der Fall ist, drosselt die Immunreaktion und kann somit den Organismus vor einer überschießenden Immunantwort schützen.

Das organische Lösungsmittel **DMSO** wirkt auf die Proliferation sowohl unstimulierter als auch stimulierter primärer humaner Lymphozyten stark inhibierend, was höchstwahrscheinlich Auswirkungen der beschriebenen zytotoxischen Eigenschaften sind. Dies zeigt sich vor allem in der Tatsache, dass unstimulierte Zellen im selben Umfang betroffen sind. Diese Zellen befinden sich in der G₀-Phase des Zellzyklus und sind deshalb in Bezug auf die Zellteilung inaktiv. Die beobachtete Abnahme des [³H]Thymidineinbaus deutet deshalb sehr stark darauf hin, dass essentielle Zellfunktionen beeinflusst werden. Dabei scheint eine DMSO-Endkonzentration von 0.1% von den Zellen – sowohl unstimuliert als auch stimuliert – gerade noch toleriert zu werden, erste deutlich inhibitorische Effekte sind ab einer DMSO-Endkonzentration von 1% zu erkennen, bei weiter steigenden Konzentrationen ist nahezu keine Proliferation mehr zu beobachten. Ab der DMSO-Endkonzentration von 2% werden praktisch alle Zellen durch das zytotoxische DMSO beeinträchtigt/getötet, was durch eine zusätzlich durchgeführte Trypanblau-Färbung bestätigt werden konnte (>95% blau angefärbte, also abgetötete Zellen). Die aus den Ergebnissen erstellte Dosis-Wirkungskurve lieferte die in **Abb. 4-43** dargestellten IC₅₀-Werte für DMSO an unstimulierten sowie an stimulierten primären humanen T-Lymphozyten.

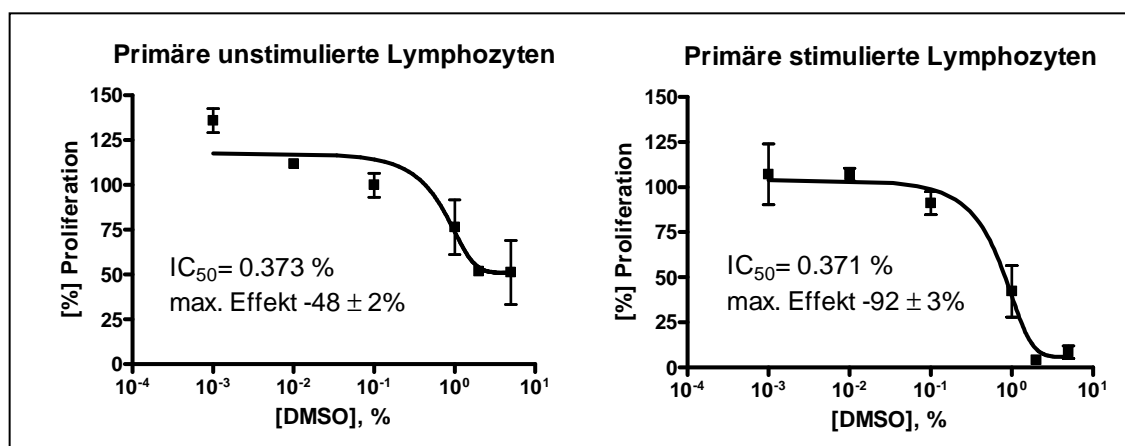


Abb. 4-43: Dosis-Wirkungskurven von DMSO. Effekte auf die Proliferation unstimulierter und PHA-stimulierter primärer humaner Lymphozyten, $n=3 \pm \text{SEM}$.

4.3 Einfluss von Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen

Parallel zu den Proliferationsversuchen an primären humanen T-Lymphozyten sollten Versuche an der humanen Leukämie-T-Zelllinie Jurkat T durchgeführt werden, die ein weit verbreitetes Testsystem für T-Lymphozyten darstellt. Bei dem Versuch der Etablierung des Assays – analog zu den Versuchen mit den primären T-Lymphozyten sollten hierbei unstimulierte und PHA-stimulierte Zellen zum Einsatz kommen – zeigte sich sehr schnell, dass die Jurkat T-Zellen von sich aus schon in sehr hohem Maße proliferieren und eine weitere Stimulation durch ein Mitogen nicht möglich ist. Die gemessenen cpm für die unstimulierten Zellen lagen im selben hohen Bereich wie die cpm für die mit PHA stimulierten Jurkat T-Zellen, ein signifikanter Unterschied war nicht zu erkennen. Obwohl in der Literatur bereits Proliferationsassays mit Jurkat T-Zellen beschrieben werden – Gillis *et al.* und andere zeigten eine verstärkte IL-2-Ausschüttung nach PHA-Stimulierung der Zellen,^{286,297} Fredholm *et al.* konnten nach Stimulierung der Jurkat T-Zellen eine vermehrte A₂-Adenosinrezeptor-vermittelte cAMP-Ausschüttung beobachten²⁹⁸ und Sasaki *et al.* beobachteten nach einer PHA-Stimulierung von Jurkat T-Zellen einen schnellen Abbau von PIP₂ und daraus resultierend eine Akkumulation von Phosphatidsäuren²⁹⁹ – ist das Assaydesign des Proliferationsassays mit einer Messung der [³H]Thymidininkorporation nicht dazu geeignet, Unterschiede zwischen Mitogen-stimulierten und unstimulierten Zellen zu detektieren. Aus diesem Grund wurden die Versuche nur mit unstimulierten, bereits von sich aus stark proliferierenden Zellen durchgeführt, mit dem Hintergrund, evtl. proliferationshemmende Effekte zu messen. Die Messung Proliferations-stimulierender Effekte ist mit dieser Methode für diese Zellen nicht möglich. Als Testsubstanzen werden dabei das Enzym **ADA** eingesetzt, als Adenosinrezeptoragonisten kommen **NECA** (us), **CPA** (A₁), **CGS 21680** (A_{2A}), **BAY60-6583** (A_{2B}) und **IB-MECA** (A₃) zum Einsatz, getestete Adenosinrezeptorantagonisten sind **Coffein** (us), **PSB-36** (A₁), **SCH-420814** (A_{2A}), **MSX-2** (A_{2A}), **PSB-1115** (A_{2B}) und **PSB-10** (A₃). Die Ergebnisse dieser Testsubstanzen auf die Proliferation von unstimulierten Jurkat T-Zellen sind in **Abb. 4-44** dargestellt.

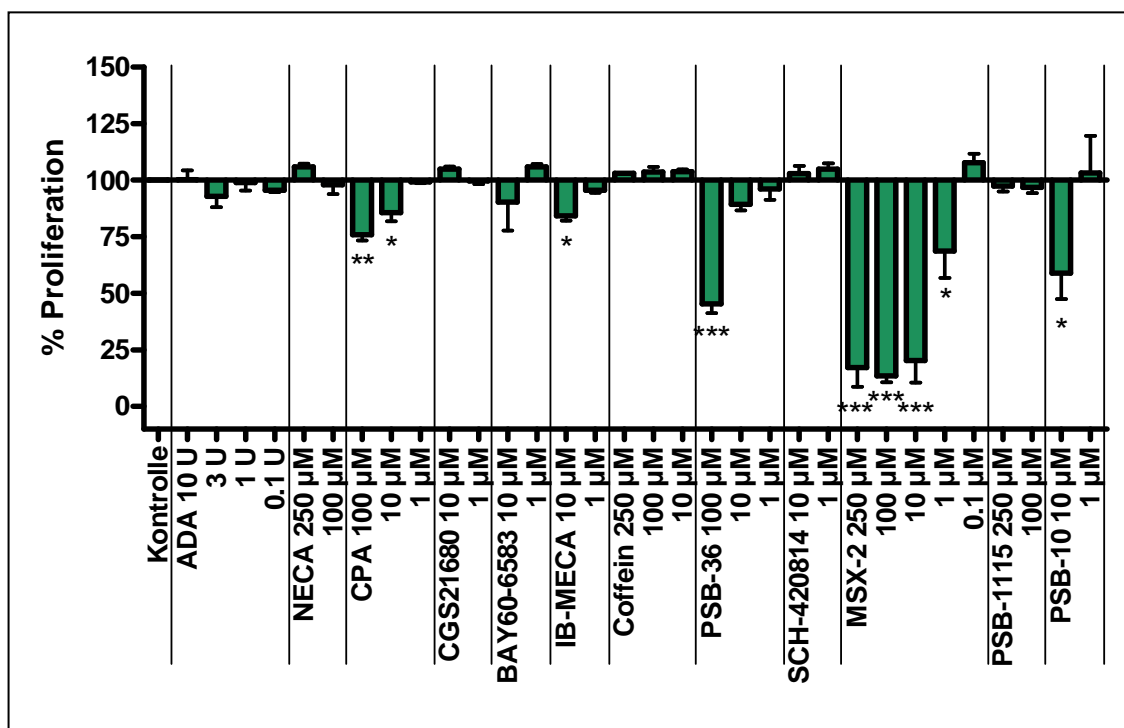


Abb. 4-44: Einfluss der Testsubstanzen auf die Proliferation unstimulierter Jurkat T-Zellen, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Die Adenosinrezeptoragonisten **CPA** (A_1) und **IB-MECA** (A_3) zeigen ab der relativ hohen Konzentration von 10 µM erste schwach Proliferations-hemmende Effekte auf Jurkat T-Zellen, sowohl ADA als auch die anderen getesteten Agonisten an Adenosinrezeptoren zeigen keinerlei Effekte. Bei den Adenosinrezeptorantagonisten besitzt vor allem **MSX-2** eindeutig stark Proliferations-hemmende Eigenschaften. Die Auswertung der erstellten Dosis-Wirkungskurve (siehe Abb. 4-45) ergab einen IC_{50} -Wert für **MSX-2** (A_{2A}) an Jurkat T von 1.64 µM. Bei **PSB-36** (A_1) und **PSB-10** (A_3) deuteten sich, allerdings erst im mittleren bis hohen mikromolaren Bereich, ebenfalls erste Proliferations-inhibierende Effekte an. Alle weiteren getesteten Substanzen zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keinerlei Effekte.

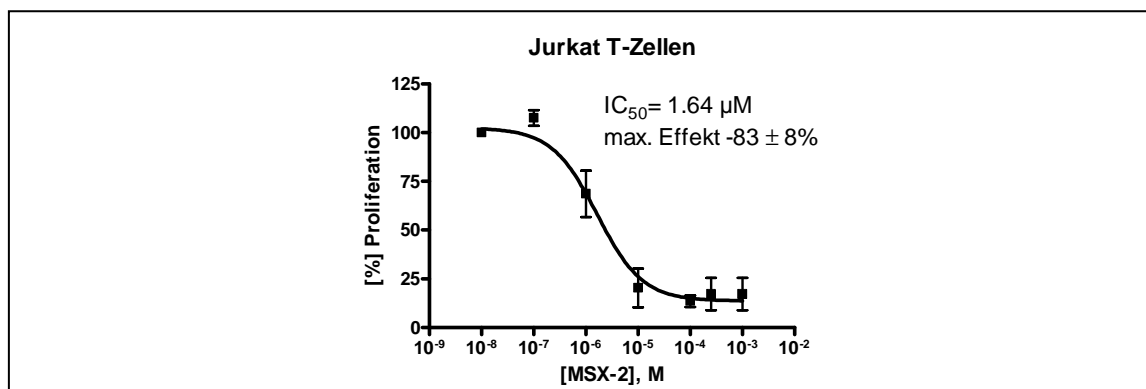


Abb. 4-45: Dosis-Wirkungskurve von MSX-2. Effekte auf die Proliferation unstimulierter Jurkat T-Zellen, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Aufgrund von Löslichkeitsproblemen bzw. da sonst die maximal tolerierte DMSO-Endkonzentration überschritten worden wäre, konnten keine höheren Testkonzentrationen eingesetzt und daher auch keine weiteren Dosis-Wirkungskurven erstellt werden. Zusammengefasst kann man jedoch sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit die Proliferations-hemmenden Effekte der Adenosinrezeptoragonisten **CPA** und **IB-MECA** sowie der Adenosinrezeptorantagonisten **PSB-36**, **MSX-2** und **PSB-10** auf Jurkat T-Zellen gezeigt werden konnten. Diese Ergebnisse stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den Effekten, die die Testsubstanzen auf die Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten zeigten.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Untersuchung der Effekte, die verschiedene (subtypselektive) Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation humaner T-Lymphozyten ausüben, zeigte sich folgendes Bild: sowohl die Adenosinrezeptoragonisten **CPA** (A_1 -selektiv), **BAY60-6583** (A_{2B} -selektiv) und **IB-MECA** (A_3 -selektiv) als auch die Antagonisten **PSB-36** (A_1), **MSX-2** (A_{2A}) und **PSB-10** (A_3) haben einen deutlich hemmenden Einfluss auf die Proliferation von T-Lymphozyten, sowohl auf primäre – unstimulierte genauso wie PHA-stimulierte Zellen – als auch auf Jurkat T-Zellen.

Tab. 4-15: Zusammenfassung der IC_{50}/EC_{50} -Werte ermittelt aus den Dosis-Wirkungskurven der Adenosinrezeptorliganden, von ADA und DMSO auf die Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten und Jurkat T-Zellen (rot = inhibierende, grün = stimulierende Effekte), us = unselektive Liganden, n.b. = nicht bestimmt.

| | | IC_{50}/EC_{50} [μM] | | |
|-------------------------------|------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|
| | | primäre humane T-Lymphozyten | | Jurkat T-Zellen |
| | | unstimuliert | stimuliert | -- |
| Adenosinrezeptor-Agonisten | | | | |
| us | NECA | kein Effekt* | Effekt >250 μM | kein Effekt* |
| A_1 | CPA | 2.45 | 12.7 | Effekt >10 μM |
| A_{2A} | CGS21680 | kein Effekt* | Effekt >100 μM | kein Effekt** |
| A_{2B} | BAY60-6583 | 11.5 | 7.10 | kein Effekt** |
| A_3 | IB-MECA | 17.8 | 14.2 | Effekt >10 μM |
| Adenosinrezeptor-Antagonisten | | | | |
| us | Coffein | kein Effekt* | 104 | kein Effekt* |
| A_1 | PSB-36 | 8.19 | 7.31 | Effekt >10 μM |
| A_{2A} | MSX-2 | 10.8 | 5.04 | 1.64 |
| | SCH-420814 | kein Effekt** | Effekt >10 μM | kein Effekt** |
| A_{2B} | PSB-1115 | kein Effekt* | kein Effekt* | kein Effekt* |
| | PSB-603 | kein Effekt** | Effekt >10 μM | n.b. |
| A_3 | PSB-10 | 4.61 | 14.4 | Effekt >1 μM |
| Andere | | | | |
| | ADA | 0.0927 I.U. | kein Effekt** | kein Effekt** |
| | DMSO | 0.373 % | 0.371 % | n.b. |

* kein Effekt 250 μM , ** kein Effekt 10 μM bzw. 10 I.U.

Die Ergebnisse deuten recht deutlich auf einen Rezeptor-unabhängigen, zytotoxischen Effekt der Substanzen hin. **Coffein** zeigte einen Proliferations-stimulierenden Effekt auf bereits stimulierte primäre T-Lymphozyten. Dies kann mit den vielfältigen physiologischen Wirkungen der Methylxanthine erklärt werden, die diese Substanzklasse neben

ihrer Eigenschaft als Adenosinrezeptorantagonisten besitzt, hauptverantwortlich ist vermutlich der aufhebende Effekt von **Coffein** auf Kontrollpunkte im Zellzyklus. Das Enzym **ADA** zeigte erwartungsgemäß einen stimulierenden Effekt auf unstimulierte primäre Zellen, was die These der T-Zell-vermittelten immunsuppressiven Wirkung von endogenem Adenosin untermauert. Die aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelten IC_{50}/EC_{50} -Werte für die getesteten Adenosinrezeptorliganden bzw. **ADA** und **DMSO** sind in **Tab. 4-15** zusammengefasst. Sie liegen allesamt im unteren mikromolaren Bereich. Es konnte auch gezeigt werden, dass **DMSO**-Konzentrationen größer als 0.1% einen negativen Einfluß auf Zellfunktionen und Viabilität nehmen.

Weitergehende Versuche scheinen unerlässlich, die genauen Mechanismen der Proliferationshemmung durch die verschiedenen Adenosinrezeptorliganden, Agonisten wie auch Antagonisten, zu klären. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse scheint es eindeutig, dass durch die getesteten Substanzen apoptotische Vorgänge während dem Durchlaufen des Zellzyklus in den Zellen eingeleitet werden. Dies könnte z.B. durch zusätzliche mikroskopische oder durchfluss-zytometrische Messungen an einem FACS-Gerät (Messung der Änderung der Chromatindichte im Zellkern) oder durch (Agarose-)Gelelektrophorese (Auftrennung von bereits fragmentierten DNA-Stücken geringen Molekulargewichts) bestätigt werden. Auch eine Abgrenzung zu evtl. ablaufenden Nekrose-Mechanismen sollte gemacht werden. Zur Klärung der Frage des Angriffsortes der Substanzen (extrazellulär vs. Intrazellulär) wäre ein Ansatzpunkt, den Transportmechanismus der Substanzen in das Zellinnere zu untersuchen und daraufhin diesen ggf. zu inhibieren. Sind die Angriffsorte der Substanzen wirklich intrazellulär lokalisiert, so dürften sich die Effekte dadurch deutlich verringern oder ganz inhibiert werden. Um einen evtl. Einbau der Substanzen in die DNA und die dadurch bedingte Apoptose zu untersuchen wäre es denkbar, falls erhältlich, radioaktiv markierte Testsubstanzen einzusetzen und nach Beendigung der Versuche die DNA aufzureinigen und die evtl. darin enthaltene Radioaktivität zu messen. Auch der Möglichkeit, dass evtl. aus den Substanzen entstehende Metabolite für die Zytotoxizität verantwortlich sein könnten, müsste nachgegangen werden.

5 Charakterisierung verschiedener Baldrianextrakte als Adenosinrezeptorliganden

5.1 Einleitung

Für die weitere Charakterisierung von Adenosinrezeptoren, deren Expressionsdichten und der gekoppelten Signaltransduktionskaskaden ist es unerlässlich, auf ein breites Spektrum an pharmakologischen Werkzeugen zurückgreifen zu können. Ebenso wichtig ist die ständige Suche nach neuen, affinen und subtypselektiven Liganden als Leitstrukturen zur Entwicklung potentieller neuartiger Wirkstoffe für den Einsatz in die Therapie/als Diagnostika. Neben der rein chemischen Synthese ist eine weitere Möglichkeit, neue Leitstrukturen aus Pflanzeninhaltsstoffen zu isolieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb verschiedene Baldrianextrakte auf aktive Komponenten an Adenosinrezeptoren untersucht werden.



Abb. 5-46: Echter Baldrian – *Valeriana officinalis* L.

(Quellen: linkes Bild: www.wikipedia.org/wiki/Echter_Baldrian,;
rechtes Bild: www.awl.ch/heilpflanzen/aktuell/briefmarken/baldrian/baldrian_marke.jpg;
Verfügbarkeitsdatum 01.11.2008)

Medizinisch-pharmazeutisch verwendeter Baldrian - *Valeriana officinalis* L. - ist eine von mehr als 250 Pflanzenarten der Pflanzengattung Baldrian, die zu der Familie der Baldriangewächse (Valerianaceae) gehört. Baldrian ist eine seit der Antike bekannte Arzneipflanze. Bereits im alten Griechenland wusste Hippokrates um die beruhigende und schlaffördernde Wirkung. Sie war im 10. Jahrhundert bei arabischen Ärzten beliebt und durfte in keinem mittelalterlichen Klostergarten fehlen; Hildegard von Bingen (1098-1179) setzte Baldrian auch gegen Brustfellentzündungen ein. Im 16. und 17. Jahrhundert wurde er zur Bekämpfung der Pest verwendet, bis er dann schließlich im 18. Jahrhundert in der wissenschaftlichen Medizin als Nerven- und Beruhigungsmittel anerkannt wurde.

Baldrian ist neben dem Johanniskraut eine der wichtigsten Heilpflanzen mit Wirkung auf das Nervensystem. Therapeutisch verwendet werden dabei die getrockneten und zerkleinerten Wurzeln, Rhizome und unterirdischen Ausläufer, die als „Valerianae radix“ auch in vielen modernen Arzneibüchern monographiert sind, so zum Beispiel im europäischen Arzneibuch (Ph. Eur., 6. Ausgabe, 2008).³⁰⁰ Extrakte der Baldrianwurzel – meist hydroalkoholische – sind vor allem in Europa weit verbreitete Phytopharmaka bzw. in den USA als Nahrungsergänzungsmittel auf dem Markt, die aufgrund ihrer sedativen Eigenschaften heute bei Unruhezuständen und nervös bedingten Einschlafstörungen angewandt werden.³⁰¹ Ferner finden sie Anwendung als Spasmolytikum bei nervös bedingten Krämpfen im Magen-Darm-Trakt sowie bei nervösem Herzklopfen aufgrund von gefäßerweiternden und antiarrhythmischen Wirkungen;³⁰¹ auch antikonvulsive und neuroprotektive Eigenschaften wurden beschrieben.³⁰² Dabei ist eine Fülle von Zubereitungen auf dem Markt: Baldrian wird als Pflanzenpresssaft, Tinktur, Tee, als Fertigpräparat in Tabletten-, Tropfen- oder Drageeform oder als Badezusatz verarbeitet, häufig in Kombination mit Hopfen, Passionsblüte, Melisse oder Johanniskraut, was die Wirkung von Baldrian zusätzlich unterstützen soll.^{303,304} Hervorzuheben ist das – insbesondere im Vergleich zu Benzodiazepinen – günstige Nebenwirkungsprofil und das zu vernachlässigende Abhängigkeitspotential von Baldrianpräparaten.^{305,306}

Die Baldrianwurzel enthält eine Vielzahl von Verbindungsklassen, so zum Beispiel ätherisches Öl, Valepotriate und deren Abbauprodukte, Alkaloide, Lignane, Flavonoide, Phenolcarbonsäuren, schwer flüchtige Sesquiterpencarbonsäuren, Aminosäuren, Fett-

säuren und Kohlehydrate.³⁰¹ Die Zusammensetzungen können je nach Art, Alter, Herkunft und den Wachstumsbedingungen der Pflanze stark variieren.

Die sedierenden Wirkungen von Baldrian konnten im Tiermodell an Mäusen durch eine Verlängerung des Barbituratschlafes eindeutig nachgewiesen werden,³⁰⁷ im Rahmen klinischer Studien an Menschen zeigten sich jedoch sehr widersprüchliche Ergebnisse.³⁰⁸ So konnten einerseits mehrere Studien eindeutig die sedierenden Effekte des Baldrians auch an Menschen zeigen,³⁰⁸⁻³¹¹ andere Studien kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf einen Schlaf anstossenden Effekt zwischen Placebo und Baldrianextrakten existieren.^{305,308,312} Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch das Design der Studien erklären. So wurden diese meist nur mit sehr geringen Probandenzahlen und häufig an jungen, gesunden Probanden durchgeführt. Auch die Dosierungen variierten beträchtlich, teilweise handelte es sich nicht um heute übliche, randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudien und auch die Bewertungskriterien waren unterschiedlich (Schlaf-EEG, Einschlafdauer, Gesamtschlafzeit, Abnahme der Wachzeit, subjektives Empfinden der Probanden). Außerdem ist allgemein bekannt, dass eine Therapie mit Phytopharmaka meist eine längere Anlaufzeit bis zum Wirkeintritt erfordert. Für viele Präparate ist auch die pharmazeutische Qualität nicht immer gewährleistet, dies gilt vor allem für die Nahrungsergänzungsmittel, die sich in den USA auf dem Markt befinden. Es scheint also, dass der Einsatz von Baldrianextrakten zur Behandlung bei Unruhezuständen und nervös bedingten Einschlafstörungen aufgrund einer leicht sedierenden Wirkung angezeigt ist. Um die Wirksamkeit jedoch eindeutig belegen zu können, müssten klinische Studien mit größeren Patientenkollektiven und standardisiertem experimentellem Design durchgeführt werden. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, die pharmakologischen Effekte der Baldrianextrakte näher zu untersuchen. Dazu wurde eine Vielzahl von Inhaltsstoffen isoliert und pharmakologisch untersucht. Der genaue molekulare Wirkmechanismus der sedierenden Wirkung konnte jedoch bis heute nicht vollständig geklärt werden. Lange Zeit schrieb man die Wirkung des Baldrians den ätherischen Ölen zu, wobei hier hauptsächlich charakteristische Sesquiterpene wie Valerensäuren und deren Derivate eine Rolle spielten.³¹³ So konnten für Valerensäure und Valerenal (siehe **Abb. 5-47**) sedative und spasmolytische Effekte beschrieben werden,³¹⁴ Acetoxy- und Hydroxyvalerensäure zeigten *in vitro* eine Hemmung des γ -Aminobuttersäure-(GABA)-Abbaus³¹⁴ und für Valeranon wurden u.a. eine

Verlängerung des Barbituratschlafes sowie antikonvulsive und antiulzerogene Eigenschaften beschrieben.³¹⁵ In den ätherischen Ölen ist außerdem Isovaleriansäure (**Abb. 5-47**) enthalten, die für den charakteristischen Geruch verantwortlich ist.

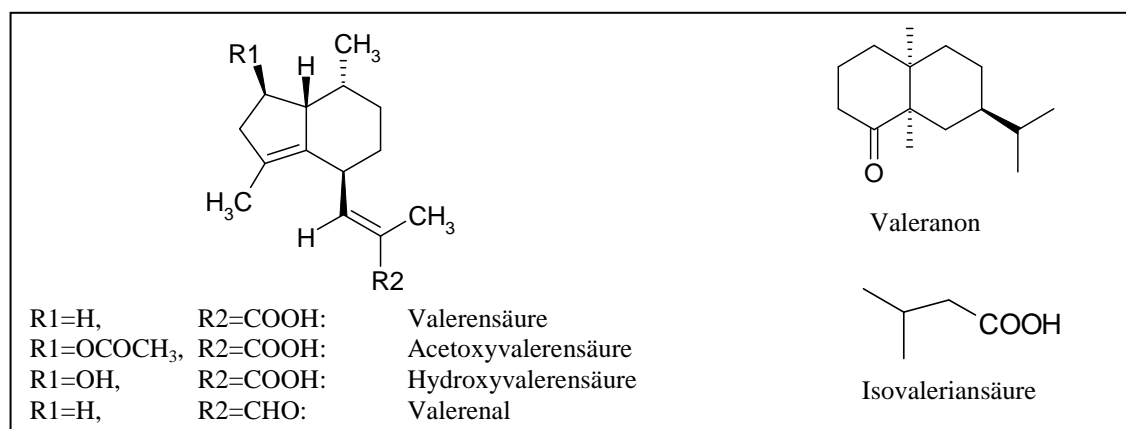


Abb. 5-47: Strukturen der Sesquiterpene sowie der Isovaleriansäure: Inhaltsstoffe des ätherischen Öls von *Valeriana officinalis* L

Eine weitere wesentliche Gruppe von Inhaltsstoffen sind die Valepotriate (Valerianaepoxy-triester), die erstmals in den 1960er-Jahren von Thies *et al.* isoliert und beschrieben wurden³¹⁶ und chemisch in die Gruppe der Iridoide gehören.³¹³ Iridoide sind Cyclopentan-c-pyran-monoterpenoide, die in vielen Pflanzenfamilien vorkommen – häufig in Form von Glykosiden. Aufgrund ihrer chemischen Struktur können Valepotriate in vier Gruppen eingeteilt werden, den Dientyp, den Monoentyp, den Valtrat-Hydrintyp und den Desoxy-Monoentyp (siehe **Abb. 5-48**).

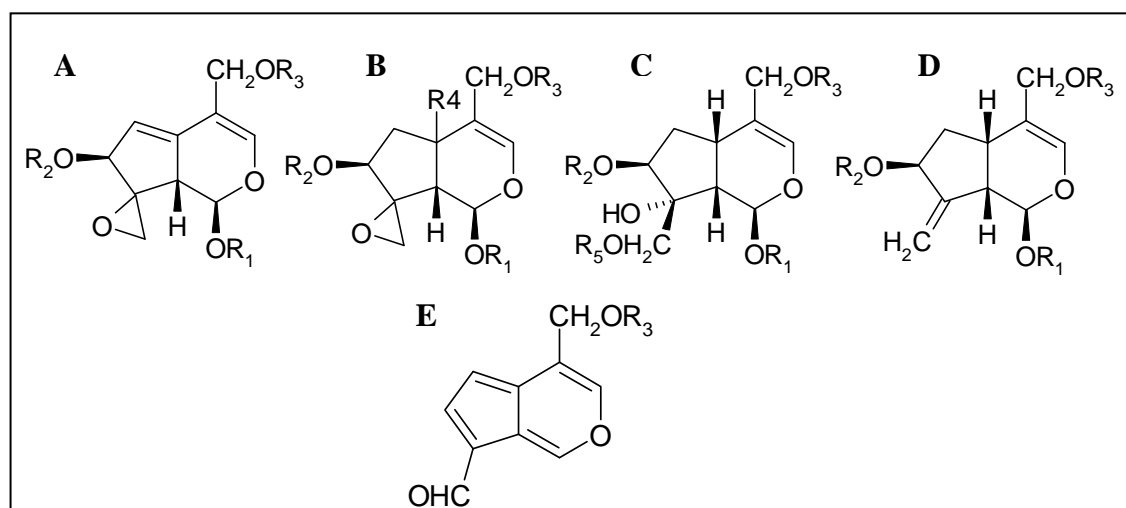


Abb. 5-48: Grundgerüste der Valepotriate vom **A.** Dientyp, **B.** Monoentyp, **C.** Valtrat-Hydrintyp, **D.** Desoxy-Monoentyp sowie **E.** der Abbauprodukte Baldrinale, nach³¹³

Valepotriate des Dientyps sind z.B. Valtrat, Isovaltrat, Acevaltrat und Diavaltrat, Vertreter der Gruppe der Valepotriate vom Monoentyp sind u.a. Didrovaltrat, Isodidrovaltrat und Isovaleryloxydidrovaltrat.³¹³ Valepotriate sind sehr instabile Verbindungen, sie sind thermolabil sowie hydrolyse- und lichtempfindlich. Die Hauptabbauprodukte der Valepotriate sind die gelb gefärbten Baldrinale (siehe **Abb. 5-48 E**), die wiederum selbst sehr reaktiv sind und zur Polymerbildung neigen. So werden Valtrat und Acevaltrat zu Baldrinal und Isovaltrat zu Homobaldrinal abgebaut.³¹³ Valepotriate vom Dien- und Monoentyp werden zusätzlich durch Öffnung des Epoxidrings in Valtrathydrine überführt. Der Beitrag der Valepotriate zur biologischen Wirkung von Baldrian scheint vernachlässigbar, da sie aufgrund ihrer sehr geringen Stabilität während der Lagerung und dem Verarbeitungsprozess rasch abgebaut werden und oft in pharmazeutischen Darreichungsformen nicht mehr vorhanden sind. Außerdem wurden für Valepotriate *in vitro* zytotoxische, mutagene und karzinogene Eigenschaften gefunden.³¹³

Nachdem Balduini und Cattabeni³¹⁷ sowie Müller *et al.*³¹⁸ zeigen konnten, dass ein hydroalkoholischer Baldrianextrakt in der Lage ist, in Radioligand-Bindungsstudien an Rattenhirncortex-Membranen den A₁-selektiven Radioliganden [³H]N⁶-Cyclohexyladenosin (CHA) konzentrationsabhängig zu verdrängen und diese Effekte auch für humane Rezeptoren gezeigt wurden,³¹⁸ konnten Schumacher *et al.* als aktive Komponente das Lignan 4'-O-β-D-Glycosyl-9-O-(6''-desoxysaccharosyl)olivil als Partialagonist am A₁AR identifizieren,¹⁵¹ den ersten nicht-nukleosidischen Agonisten an A₁AR.

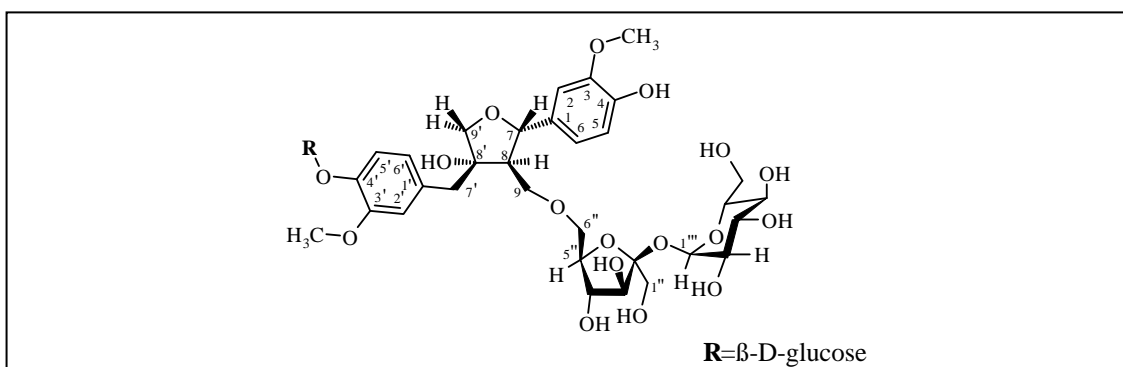


Abb. 5-49: Chemische Struktur des Lignans 4'-O-β-D-Glycosyl-9-O-(6''-desoxysaccharosyl)olivil.

Brattström *et al.* führten daraufhin *in vivo*-Studien mit gesunden Probanden durch und konnten mittels EEG-Messungen zeigen, dass eine Kombination von Baldrian- und Hopfenextrakten der zentral stimulierenden Wirkung von Coffein entgegenwirken kann.³⁰³ Adenosin wirkt im Zentralnervensystem als inhibitorischer Neuromodulator

und ist neben GABA eine der wichtigsten schlafinduzierenden Substanzen im Gehirn.³¹⁹ Es akkumuliert während der Wachphasen und aktiviert hauptsächlich A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren. Somit könnte die beobachtete partialagonistische Aktivität des Lignans an A₁AR an der sedierenden Wirkung des Baldrians beteiligt sein. Neueste Ergebnisse zeigen, dass zusätzlich zu dem partialagonistischen Effekt eines hydroalkoholischen Baldrianextrakts am A₁-Adenosinrezeptor eine weitere Komponente des Extraktes den GABA_A-Rezeptor aktivieren kann und dass diese beiden Mechanismen wohl unabhängig voneinander zu der sedierenden Wirkung von Baldrian beitragen können.³²⁰ Dies würde bedeuten, dass kein einzelner Inhaltsstoff für die Wirkung von Baldrian verantwortlich ist, sondern dass es sich um ein Zusammenspiel einzelner Komponenten über unterschiedliche Mechanismen handelt, wobei A₁-Adenosin- und GABA_A-Rezeptoren und eventuell noch weitere wie z.B. Serotoninrezeptoren an der sedierenden Wirkung von Baldrian beteiligt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit sollten Baldrianextrakte unterschiedlicher Polarität auf ihre Interaktion - einschließlich Bindungsaffinitäten und Funktionalität - mit Adenosinrezeptoren, die in hoher Dichte im Gehirn exprimiert sind (A₁ und A_{2A}), untersucht werden. Dabei sollten Fraktionen gefunden werden, die hohe Affinitäten und Aktivitäten an den untersuchten Rezeptoren aufweisen, um daraufhin eine Bioassay-geführte Fraktionierung durchzuführen und ggf. neue Leitstrukturen für die Entwicklung von Adenosinrezeptorliganden identifizieren zu können. Dafür wurden Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien zur Bestimmung der Affinitäten und [³⁵S]GTPγS-Radioligand-Bindungsstudien zur funktionellen Charakterisierung der Extrakte/Testsubstanzen durchgeführt.

5.1.1 [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien - Grundlagen

[³⁵S]GTP γ S-Radioligand-Bindungsstudien stellen eine wichtige Methode dar, um die Funktionalität eines Liganden in einem Rezeptorsystem zu untersuchen. Dabei können Vollagonisten, Partialagonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten unterschieden werden. Grundlage ist die Messung der Affinität des hydrolysestabilen, radioaktiv markierten GTP-Thio-Analogen Guanosin-5'-[γ -³⁵S]triphosphat ([³⁵S]GTP γ S) zur α -Untereinheit des G-Proteins.

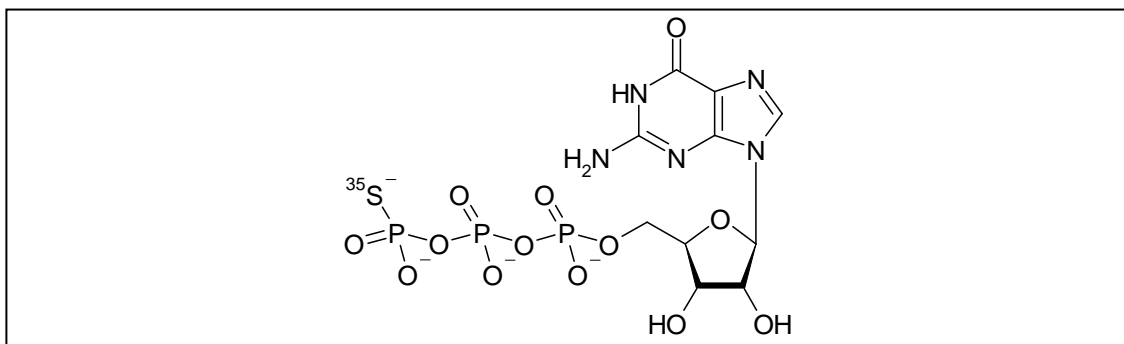


Abb. 5-50: Chemische Struktur von [³⁵S]GTP γ S

Wie bereits in **Kapitel 2.3.3** beschrieben, liegt in einer äußerlich einheitlichen Rezeptorpopulation immer ein geringer Teil der Rezeptoren in einer aktivierten Konformation (high affinity state, R*) neben Rezeptoren in nicht-aktiviertem Zustand (low affinity state, R) vor, unabhängig von einer Ligandenbindung. Für die Versuche ist es wichtig, dass das Verhältnis von Rezeptoren in der R und der R* Konformation ausbalanciert ist. Solch ein Konformationsgleichgewicht kann dadurch erreicht werden, dass zum Inkubationsansatz Magnesium- und Natriumionen sowie GDP zugegeben wird. Magnesiumionen binden allosterisch an das trimere G-Protein, begünstigen die Dissoziation von GDP, fördern die Bindung von GTP an die α -Untereinheit und unterstützen so den aktiven Zustand des Rezeptors.³²¹ Der Zusatz von Natriumionen und GDP fördert die Bildung des $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ -GDP-Komplexes und unterstützt so den inaktiven Zustand des Rezeptors.³²² Agonisten binden an den aktiven Zustand des Rezeptors und verschieben das Gleichgewicht in Richtung der aktivierten Konformation, sie bewirken einen Austausch des GDP gegen GTP, in diesem Fall GTP γ S, wodurch sich das G-Protein in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit aufspaltet und diese vom Rezeptor wegdissoziieren können (siehe **Kapitel 1.2.3**). Durch das Thio-Analoge des GTP unterbleiben die nachgeschalteten Reaktionsschritte, da durch das eingeführte Schwefelatom die endständige Phosphat-

gruppe nicht auf das Effektor-Protein übertragen werden kann, GTP γ S bleibt an die α -Untereinheit des G-Proteins gebunden und es kommt nach einer Stimulierung der Rezeptoren durch Agonisten zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der [35 S]GTP γ S-Bindung. Neutrale Antagonisten binden an beide Rezeptorzustände gleichermaßen und haben keinen Einfluss auf die Gleichgewichtseinstellung, auch aktivieren sie keine nachgeschalteten Signaltransduktionswege. Die G-Protein-Kopplung bleibt unverändert und somit auch die [35 S]GTP γ S-Bindung. Man stellt sich vor, dass inverse Agonisten bevorzugt an die nicht aktivierte Konformation R des Rezeptors binden und das Gleichgewicht zugunsten der nicht aktivierten Konformation verschieben. Somit nimmt bei einer Rezeptorbindung von inversen Agonisten die [35 S]GTP γ S-Bindung im Vergleich zum Basalwert ab (siehe auch **Abb. 5-51**).^{289,323}

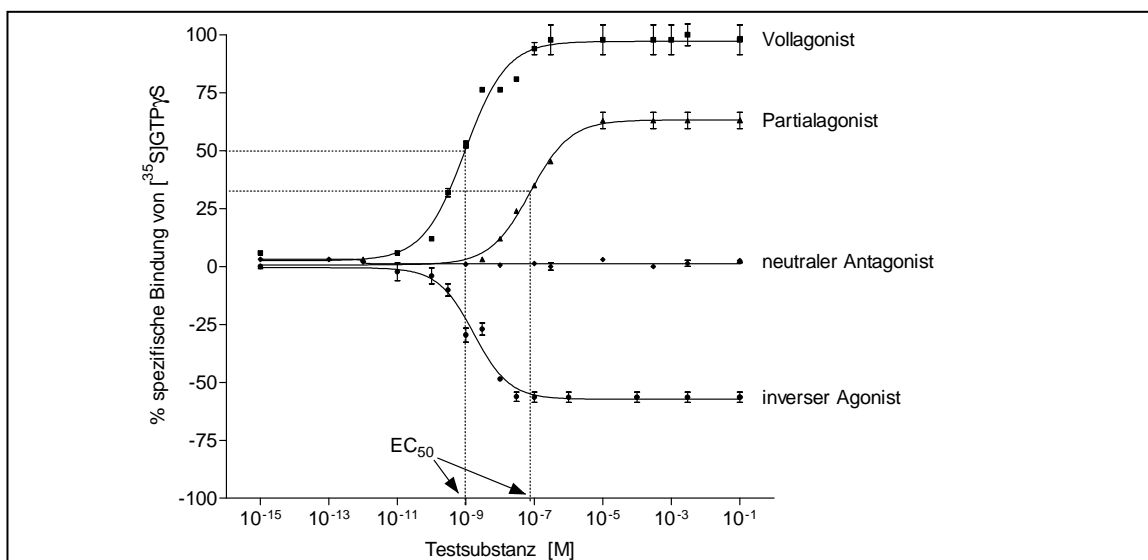


Abb. 5-51: Beispielkurven eines [35 S]GTP γ S-Bindungsexperiments.

5.2 Interaktion verschiedener hydroalkoholischer Baldrianextrakte mit A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren

Ausgehend von vorangegangenen Untersuchungen hydroalkoholischer Baldrian- und Baldrian-Hopfenextrakte an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren^{318,324} sollten im Rahmen dieser Arbeit hydroalkoholische Extrakte getestet werden, die Extrakte weisen dabei Unterschiede in der Extraktionsmethode und/oder der Zusammensetzung auf.

5.2.1 Testung der Extrakte 1-5 an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren

Bei den unten aufgeführten Extrakten **1-5** handelt es sich um hydroalkoholische Baldrianextrakte, die mit Hilfe der Auszugsmittel Ethanol oder Methanol gewonnen wurden und teilweise mit Hopfen- und Passionsblumenkrautextrakten kombiniert sind. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Dr. H. Häberlein, Institut für physiologische Chemie der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt. Die Extrakte sind alle in auf dem Markt befindlichen, kommerziell erhältlichen Baldrianzubereitungen eingesetzt und waren dabei im Einzelnen:

1: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 40 % (v/v), Trockenextrakt aus Hopfenzapfen (Ethanol 40 % v/v), Trockenextrakt aus Passionsblumenkraut (Ethanol 50 % v/v).

2: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 70 % (v/v).

3: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Methanol 45 % (m/m), Trockenextrakt aus Hopfenzapfen (Methanol 45 % m/m).

4: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 70 % (v/v), Trockenextrakt aus Hopfenzapfen (Ethanol 40 % v/v).

5: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 70 % (v/v), Trockenextrakt aus Hopfenzapfen (Ethanol 40 % v/v), Trockenextrakt aus Passionsblumenkraut (Ethanol 50 % v/v).

In **Tabelle 5-16** sind die Affinitäten der Extrakte an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren dargestellt.

Tab. 5-16: Affinitäten der Baldrianextrakte **1-5** an Ratten-A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren (Cortex- bzw. Striatum-Membranpräparationen), n=3 ± SEM.

| | A ₁ vs. [³ H]CCPA Rattencortex | A _{2A} vs. [³ H]MSX-2 Rattenstriatum |
|----------|--|--|
| | K _i ± SEM (mg/ml) ^a | % Inhibition der RL-Bindung bei 1 mg/ml |
| 1 | 0.303 ± 0.005 | 23 ± 1 |
| 2 | 0.276 ± 0.051 | 28 ± 1 |
| 3 | 0.349 ± 0.052 | 33 ± 5 |
| 4 | 0.267 ± 0.022 | 23 ± 2 |
| 5 | 0.132 ± 0.016 | 28 ± 5 |

^a Berechnet mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung,³²⁵ Extrakte in mg/ml anstatt M eingesetzt.

Es zeigte sich, dass alle fünf untersuchten Extrakte relativ hohe, konzentrationsabhängige Bindungsaffinitäten an Ratten-A₁-Adenosinrezeptoren zeigten. Die bestimmten K_i-Werte liegen mit 132 µg/ml bis 349 µg/ml in guter Übereinstimmung mit den Werten, die Müller *et al.* für die von ihnen getesteten Baldrianextrakte bestimmen konnten.³¹⁸ Die Unterschiede der K_i-Werte am A₁AR waren gering und statistisch nicht signifikant. Die Extrakte zeigten wesentlich geringere Bindungsaffinitäten an A_{2A}-Adenosinrezeptoren; auch diese Tatsache ist in guter Übereinstimmung mit vorhergehenden Ergebnissen.³¹⁸

Die funktionellen Eigenschaften der Baldrianextrakte wurden mit Hilfe von [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an humanen A₁AR, exprimiert auf chinesischen Hamster-Ovarialzellen (CHO-Zellen), untersucht (siehe **Kap. 5.1.1**). Der A₁AR-Agonist N⁶-Cyclopentyladenosin (**CPA**) führte zu einer Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung von 236 ± 25 %, n=5, der Effekt wurde gleich 100 % gesetzt. Die zugehörigen Kurven sind in **Abb. 5-52** dargestellt. Alle fünf untersuchten Baldrianextrakte stimulierten die [³⁵S]GTPγS-Bindung und zeigten damit agonistische Eigenschaften an A₁AR. Da sie nur ca. 52-72 % des **CPA**-Effektes erreichen konnten (siehe **Tab. 5-17**), können alle Extrakte als partialagonistisch am A₁AR eingestuft werden.

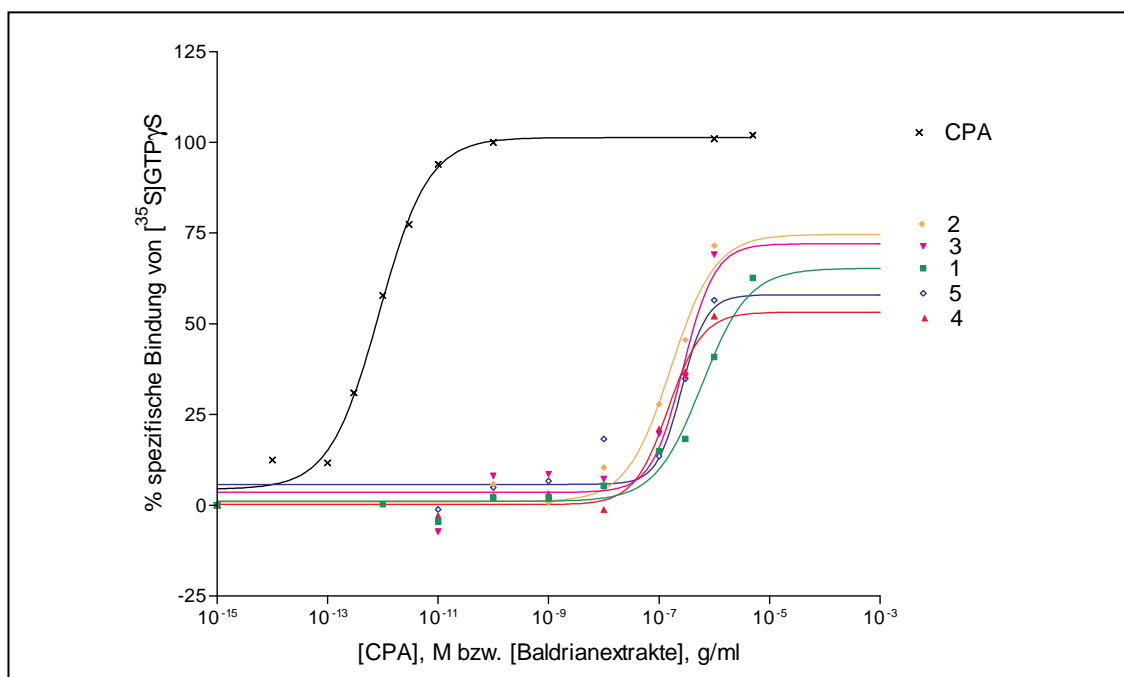


Abb. 5-52: [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperiment an humanen rekombinanten A_1 -Adenosinrezeptoren. Die Werte der Extrakte 1-5 sind auf die Daten des Vollagonisten CPA = 100% normalisiert ($n=4$).

Die bestimmten EC_{50} -Werte (siehe **Tab. 5-17**) korrelieren sehr gut mit den K_i -Werten, sie liegen im Bereich zwischen 164 $\mu\text{g/ml}$ und 598 $\mu\text{g/ml}$. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Extrakten festgestellt werden, sowohl EC_{50} -Werte als auch die maximalen Effekte liegen im selben Konzentrationsbereich.

Tab. 5-17: Funktionelle Charakterisierung der Baldrianextrakte **1-5** an humanen A_1AR mittels [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien. Dargestellt sind EC_{50} -Werte und % maximale Stimulierung im Vergleich zu dem maximalen Effekt des Vollagonisten CPA (=100%), $n=3 \pm \text{SEM}$.

| | $\text{EC}_{50} \pm \text{SEM}$ (mg/ml) | % max. Stimulierung bezogen auf den max. Effekt des Voll- agonisten CPA (=100 %) |
|--------------------------|--|--|
| CPA (Vollagonist) | $0.852 \pm 0.611 \text{ nM}$ | 100 |
| 1 | 0.598 ± 0.632 | 63 ± 4 |
| 2 | 0.273 ± 0.677 | 56 ± 4 |
| 3 | 0.170 ± 0.673 | 72 ± 10 |
| 4 | 0.164 ± 0.639 | 52 ± 4 |
| 5 | 0.257 ± 0.680 | 69 ± 5 |

Zusätzlich wurden [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuche durchgeführt, bei denen eine hohe Konzentration der Extrakte **1-5** (1 mg/ml) bzw. **CPA** (10 μM) einmal in Anwesenheit

und einmal in Abwesenheit des A_1 -Adenosinrezeptorantagonisten **DPCPX** (100 nM) gemessen wurden. Wie in **Abb. 5-53** deutlich zu erkennen, war **DPCPX** überall in der Lage, die durch die (Partial-)Agonisten induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung zu inhibieren. Dadurch konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den beobachteten Effekten der Baldrianextrakte **1-5** um A_1 -Adenosinrezeptor-vermittelte Effekte handelt.

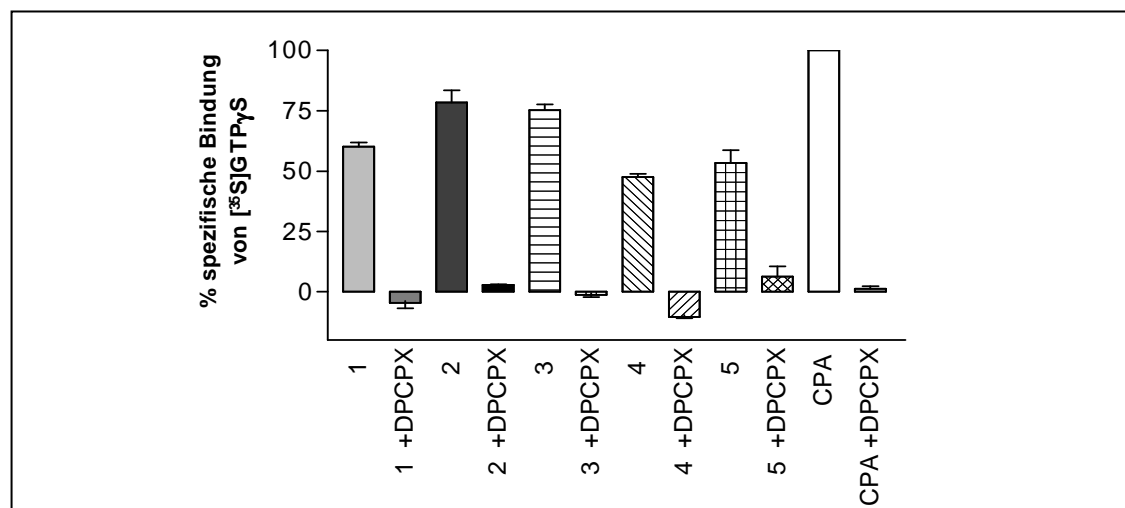


Abb. 5-53: [35 S]GTP γ S-Bindungsexperiment an humanen rekombinanten A_1 -Adenosinrezeptoren in An- bzw. Abwesenheit einer hohen Konzentration (100 nM) des A_1 AR-Antagonisten **DPCPX**. Die Extrakte **1-5** sind bei einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt, **CPA** bei 10 μ M, $n=4 \pm$ SEM.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass es sich bei den untersuchten Extrakten **1-5** um Partialagonisten am A_1 -Adenosinrezeptor mit Affinitäten (K_i -Werten) im Bereich zwischen 100 μ g/ml und 300 μ g/ml handelt. Die Affinitäten der Extrakte am A_{2A} -Adenosinrezeptor sind vernachlässigbar. Es konnten keine signifikanten Unterschiede – weder in Bezug auf Affinität noch auf ihre funktionelle Aktivität – zwischen den fünf untersuchten Baldrianextrakten gefunden werden.

5.2.2 Testung der Extrakte 6-8 an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren

In einer weiteren Versuchsreihe sollten die drei hydroalkoholischen Baldrianextrakte **6-8** ebenfalls auf ihre Affinitäten und funktionelle Aktivitäten an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren getestet werden. Die Extrakte waren:

6: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 70 % (v/v).

7: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 60 % (m/m).

8: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Methanol 45 % (m/m).

Auch diese Extrakte zeigten ein für hydroalkoholische Baldrianextrakte typisches Affinitäts- und Aktivitätsprofil, die K_i-Werte am A₁AR liegen im Bereich zwischen 100 µg/ml und 200 µg/ml, die Affinitäten an A_{2A}AR sind vernachlässigbar (siehe **Tab. 5-18**) und alle drei untersuchten Baldrianextrakte besitzen partialagonistische Eigenschaften (siehe **Abb. 5-54 A**), die eindeutig A₁AR-vermittelt sind (siehe **Abb. 5-54 B**). Die bestimmten K_i-Werte bzw. EC₅₀-Werte korrelieren sehr gut und unterscheiden sich für alle drei Extrakte nicht signifikant. Einzig für die Höhe des maximalen Effektes im [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuch konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden, Extrakt **6** zeigte mit einem maximalen Effekt von 55% des Effektes des Vollagonisten **CPA** eine signifikant höhere intrinsische Aktivität als die beiden Extrakte **7** und **8** (28 % bzw. 35 %), siehe **Tab. 5-19** und **Abb. 5-54**.

Tab. 5-18: Affinitäten der Baldrianextrakte **6-8** an Ratten-A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren (Cortex- bzw. Striatum-Membranpräparationen), n=3 ± SEM.

| | A ₁ vs. [³ H]CCPA Rattencortex | A _{2A} vs. [³ H]MSX-2 Rattenstriatum | |
|----------|--|--|---------------------------------|
| | K _i ± SEM (mg/ml) | % Inhibition der RL-Bindung bei 1 mg/ml | K _i ± SEM (mg/ml) |
| 6 | 0.109 ± 0.014 | 23 ± 1 | n.d. |
| 7 | 0.206 ± 0.017 | 17 ± 4 | n.d. |
| 8 | 0.158 ± 0.015 | 19 ± 1 | n.d. |

Tab. 5-19: Funktionelle Charakterisierung der Baldrianextrakte **6-8** an humanen A_1 AR mittels [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien. Dargestellt sind EC_{50} -Werte und % maximale Stimulierung im Vergleich zu dem maximalen Effekt des Vollagonisten CPA (=100%), $n=3 \pm$ SEM.

| | $EC_{50} \pm$ SEM (mg/ml) | % max. Stimulierung bezogen auf den max. Effekt des Voll- agonisten CPA (=100 %) |
|--------------------------|--|--|
| CPA (Vollagonist) | 0.852 ± 0.611 nM | 100 |
| 6 | 0.027 ± 0.011 | 55 ± 7 |
| 7 | 0.244 ± 0.037 | 28 ± 5 |
| 8 | 0.127 ± 0.028 | 35 ± 3 |

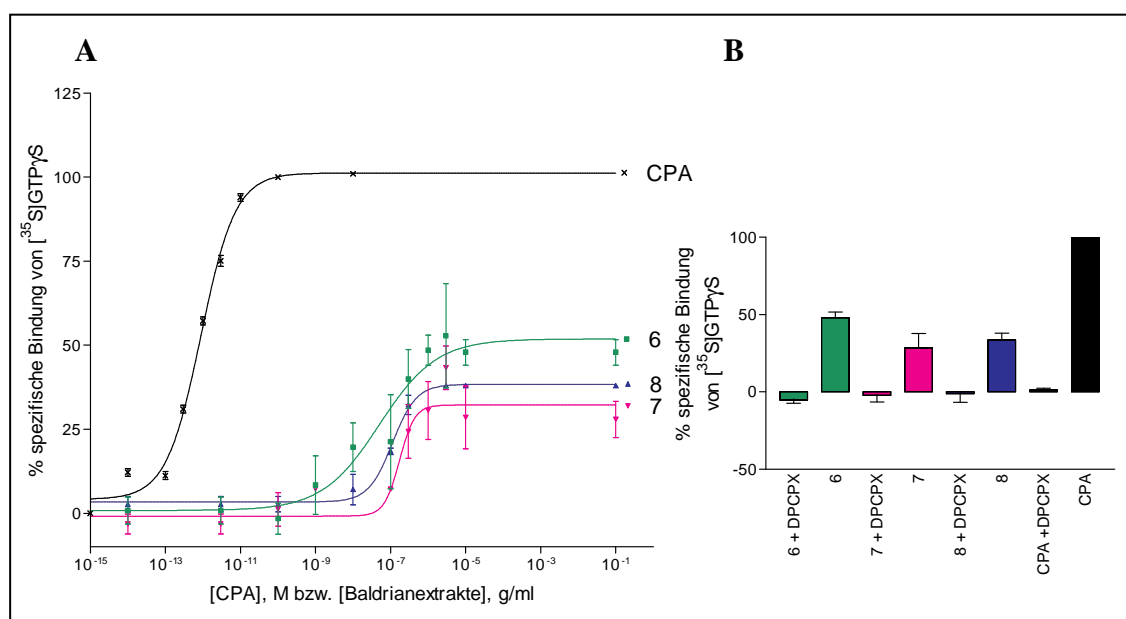


Abb. 5-54: [35 S]GTP γ S-Bindungsexperiment an humanen rekombinanten A_1 -Adenosinrezeptoren. Die Werte der Extrakte **6-8** sind auf die Daten des Vollagonisten CPA als 100% normalisiert. **A.** Bindungskurven, **B.** [35 S]GTP γ S-Bindung in An- bzw. Abwesenheit einer hohen Konzentration (100 nM) des A_1 AR-Antagonisten **DPCPX**. Die Extrakte **6-8** sind bei einer Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt, CPA bei 10 μ M, $n=3 \pm$ SEM.

5.2.3 Testung der Extrakte 9-12 an A₁-Adenosinrezeptoren

In einer dritten Versuchsreihe sollten die vier hydroalkoholischen Baldrianextrakte **9-12** auf ihre Affinitäten und funktionelle Aktivitäten an A₁-Adenosinrezeptoren getestet werden. Die Extrakte **9** bis **11** wurden aus kommerziell erhältlichen Baldrianzubereitungen isoliert, dabei waren die Extrakte im Einzelnen:

9: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Methanol 45 % (m/m).

10: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 70 % (v/v).

11: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 70 % (v/v).

12: Trockenextrakt aus Baldrianwurzel, Auszugsmittel Ethanol 70 % (v/v).

Da in vorangegangenen Versuchsreihen mehrfach gezeigt werden konnte, dass hydroalkoholische Extrakte keine Affinitäten an A_{2A}AR zeigen, wurde auf diese Versuche verzichtet. Auch diese Extrakte zeigten ein für hydroalkoholische Baldrianextrakte typisches Affinitäts- und Aktivitätsprofil, die K_i-Werte am A₁AR liegen im Bereich zwischen 20 µg/ml und 140 µg/ml (**Tab. 5-20**), alle vier untersuchten Baldrianextrakte besitzen partialagonistische Eigenschaften am A₁AR (siehe **Abb. 5-55**). Die bestimmten K_i-Werte bzw. EC₅₀-Werte korrelieren sehr gut und unterscheiden sich jeweils für alle vier Extrakte nicht signifikant. Auch für die Höhe des maximalen Effektes im [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuch konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, siehe **Tab. 5-20** und **Abb. 5-55**.

Tab. 5-20: Affinitäten der Baldrianextrakte **9-12** an Ratten- A_1 -Adenosinrezeptoren (Cortex-Membranpräparation) und funktionelle Charakterisierung an humanen A_1 AR mittels [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien. Dargestellt sind EC_{50} -Werte und % maximale Stimulierung im Vergleich zu dem maximalen Effekt des Vollagonisten CPA (=100%), $n=3 \pm$ SEM.

| | A_1 vs. [3 H]CCPA Rattencortex | [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien an CHO-h A_1 | |
|------------|---|--|---|
| | $K_i \pm$ SEM (mg/ml) | $EC_{50} \pm$ SEM (mg/ml) | % max. Stimulierung bezogen auf den max. Effekt des Vollago- nisten CPA (=100 %) |
| CPA | 0.32 nM ⁷² | 0.852 \pm 0.611 nM | 100 |
| 9 | 0.137 \pm 0.007 | 0.515 \pm 0.126 | 22 \pm 3 |
| 10 | 0.0205 \pm 0.0032 | 0.296 \pm 0.053 | 18 \pm 1 |
| 11 | 0.112 \pm 0.011 | 0.392 \pm 0.160 | 25 \pm 2 |
| 12 | 0.0215 \pm 0.0012 | 0.273 \pm 0.115 | 25 \pm 3 |

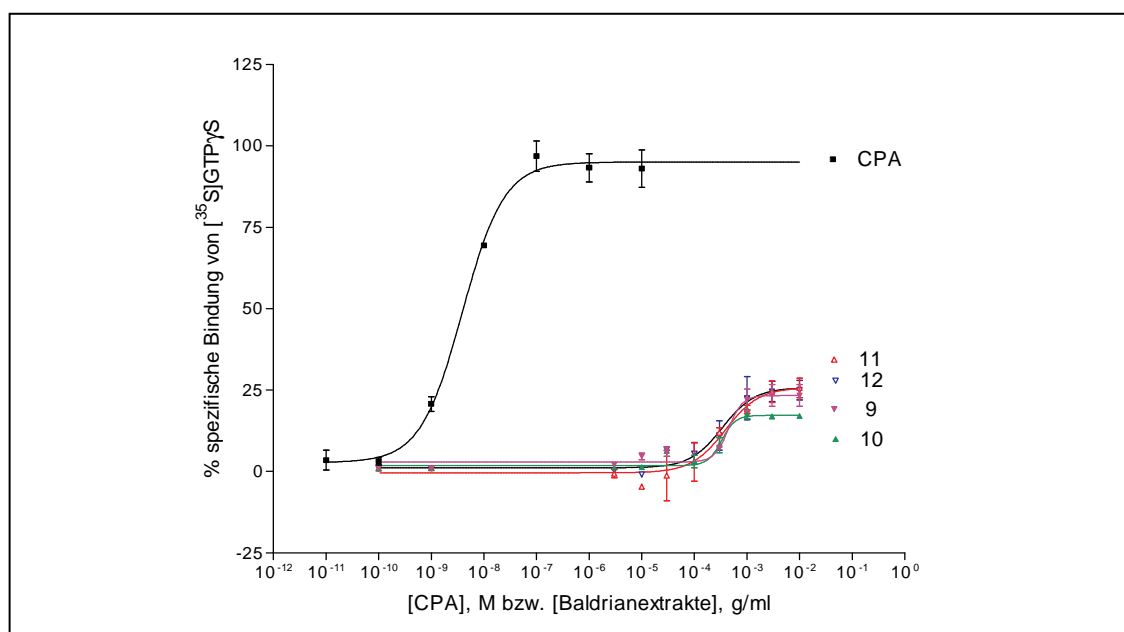


Abb. 5-55: [35 S]GTP γ S-Bindungsexperiment an humanen rekombinanten A_1 -Adenosinrezeptoren. Die Werte der Extrakte **9-12** sind auf die Daten des Vollagonisten CPA als 100% normalisiert, $n=3 \pm$ SEM.

5.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es sich bei allen untersuchten hydroalkoholischen Baldrianextrakten um Partialagonisten am A_1 -Adenosinrezeptor mit Affinitäten (K_i -Werten) im Bereich zwischen 20 $\mu\text{g/ml}$ (Extrakt **10**) und 350 $\mu\text{g/ml}$ (Extrakt **3**) handelt, siehe **Tab. 5-21**. Die Affinitäten aller untersuchter Extrakte am A_{2A} AR waren vernachlässigbar. Diese Ergebnisse sind in sehr guter Übereinstimmung mit vorangehenden Studien.^{317,318} Auch die in funktionellen Untersuchungen bestimmten EC_{50} -Werte lagen für alle Extrakte in derselben Größenordnung im Bereich zwischen 27 $\mu\text{g/ml}$ (Extrakt **6**) und 598 $\mu\text{g/ml}$ (Extrakt **1**), wobei die K_i -Werte in den meisten Fällen auch sehr gut mit den EC_{50} -Werten korrelierten.

Tab. 5-21: Affinitäten der Baldrianextrakte **1-12** (grau hinterlegt: methanolische Extrakte) an Ratten- A_1 -Adenosinrezeptoren (Cortex-Membranpräparation) und funktionelle Charakterisierung an humanen A_1 AR mittels [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien. Dargestellt sind EC_{50} -Werte und % maximale Stimulierung im Vergleich zu dem maximalen Effekt des Vollagonisten CPA (=100%), $n=3 \pm \text{SEM}$.

| | A_1 vs. [^3H]CCPA Rattencortex | [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien an CHO-h A_1 | |
|------------|--|---|--|
| | $K_i \pm \text{SEM}$ (mg/ml) | $EC_{50} \pm \text{SEM}$ (mg/ml) | % max. Stimulierung bezogen auf den max. Effekt des Vollagonisten CPA (=100 %) |
| CPA | 0.32 nM ⁷² | 0.852 \pm 0.611 nM | 100 |
| 1 | 0.303 \pm 0.005 | 0.598 \pm 0.632 | 63 \pm 4 |
| 2 | 0.276 \pm 0.051 | 0.273 \pm 0.677 | 56 \pm 4 |
| 3 | 0.349 \pm 0.052 | 0.170 \pm 0.673 | 72 \pm 10 |
| 4 | 0.267 \pm 0.022 | 0.164 \pm 0.639 | 52 \pm 4 |
| 5 | 0.132 \pm 0.016 | 0.257 \pm 0.680 | 69 \pm 5 |
| 6 | 0.109 \pm 0.014 | 0.027 \pm 0.011 | 55 \pm 7 |
| 7 | 0.206 \pm 0.017 | 0.244 \pm 0.037 | 28 \pm 5 |
| 8 | 0.158 \pm 0.015 | 0.127 \pm 0.028 | 35 \pm 3 |
| 9 | 0.137 \pm 0.007 | 0.515 \pm 0.126 | 22 \pm 3 |
| 10 | 0.0205 \pm 0.0032 | 0.296 \pm 0.053 | 18 \pm 1 |
| 11 | 0.112 \pm 0.011 | 0.392 \pm 0.160 | 25 \pm 2 |
| 12 | 0.0215 \pm 0.0012 | 0.273 \pm 0.115 | 25 \pm 3 |

Unterschiede zwischen den Extrakten bestehen in der Höhe der intrinsischen Aktivität, gemessen in [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien als % der maximalen Stimulierung bezogen auf den maximalen Effekt des Vollagonisten **CPA**. Hier zeigten sich Werte von 18 % für Extrakt **10** bis hin zu 72 % für Extrakt **3**.

Eine Korrelation zwischen den alkoholischen Extraktionsmitteln und den Affinitäten bzw. funktionellen Aktivitäten konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht festgestellt werden. In **Tab. 5-21** sind die methanolischen Baldrianextrakte grau hinterlegt, während es sich bei den übrigen Extrakten um ethanolische Extrakte handelt. Die methanolischen Extrakte (**3**, **8** und **9**) wurden mit 45% (m/m) wässrigem Methanol extrahiert, während es sich bei den ethanolischen Extrakten um Auszüge mit wässrigem Ethanol 40% (V/V) (Extrakt **1**), 60% (V/V) (Extrakt **7**) oder 70% (V/V) (Extrakte **2**, **4**, **5**, **6**, **10**, **11** und **12**) handelt. Dabei sind keinerlei Abhängigkeiten in Bezug auf Affinität oder intrinsische Aktivität zu erkennen.

5.3 Interaktion von Baldrianextrakten unterschiedlicher Polarität mit A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren

Im Rahmen dieser Arbeit sollten aufbauend auf Studien der Interaktion ethanolischer und methanolischer Baldrianextrakte mit Adenosinrezeptoren (siehe **Kapitel 5.2**) Baldrianextrakte unterschiedlicher Polarität ebenfalls auf ihre Bindungsaffinitäten und Funktionalität an Adenosinrezeptoren untersucht werden. Dabei wurden hauptsächlich A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren untersucht, da diese eine hohe Expressionsdichte im Gehirn besitzen.¹⁶ Ziel war es dabei, Fraktionen zu identifizieren, die hohe Affinitäten bzw. funktionelle Aktivitäten an Adenosinrezeptoren besitzen, um daraus gegebenenfalls neue Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Adenosinrezeptorliganden ableiten zu können.

5.3.1 Extraktionsmethoden zur Gewinnung der Baldrianextrakte

Die Extrakte wurden aus zwei kommerziell erhältlichen, geschnittenen und getrockneten Baldrianwurzelzubereitungen gewonnen. Es handelte sich dabei um die beiden polnischen Baldriansorten (*Valeriana officinalis* L), die unter den Handelsmarken „Kawon“ (K) und „Lublin“ (L) vertrieben werden und über eine polnische Apotheke bezogen wurden. Beide Sorten gelten als sehr reich an Lignanenen. Vor den Extraktionen wurden die Wurzelstücke sehr fein gemahlen. Die nach der Extraktion erhaltenen Extrakte wurden lyophilisiert und dadurch von Lösungsmittelrückständen befreit. Die getrockneten Extrakte wurden dann zu Stammlösungen in DMSO angesetzt.

Die Extraktionen und weitergehende Fraktionierungen sowie analytische Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. Ralf Mayer, Arbeitskreis von Prof. Dr. C.E. Müller, Universität Bonn durchgeführt.

5.3.1.1 Extraktionsmethode A³²⁶

Die gepulverten Baldrianwurzeln (K und L) wurden zuerst jeweils in Methanol suspendiert, extrahiert und getrocknet, daraus resultieren die Methanol-Direktextrikte **KA-dir** und **LA-dir**. Diese beiden Methanolextrakte wurden in Wasser resuspendiert und mit einer 1:1-Mischung aus Petrolether-Diethylether rückextrahiert (**KA-1** und **LA-1**), die verbleibenden Wassersuspensionen wurden weiter zuerst mit Chloroform (**KA-2** und **LA-2**) und dann mit *n*-Butanol (**KA-3** und **LA-3**) rückextrahiert, zum Schluss wurden die nun verbleibenden Wassersuspensionen lyophilisiert, was die Extrakte **KA-4** und **LA-4** ergibt. Die Feststoff-Wurzelsrückstände, die nach der initialen Methanolextraktion zurückgeblieben waren, wurden zusätzlich mit Wasser (80°C) extrahiert (**KA-5** und **LA-5**), siehe auch **Abb. 5-56**.

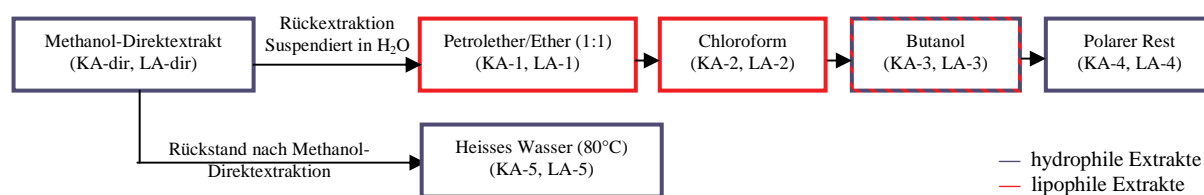


Abb. 5-56: Extraktionsmethode A zur Gewinnung der Baldrianextrakte KA-dir, LA-dir und KA-1 bis 5 bzw. LA-1 bis 5.

5.3.1.2 Extraktionsmethode B³²⁶

Die gepulverten Baldrianwurzeln (K und L) wurden direkt mit einer 1:1-Mischung aus Petrolether-Diethylether versetzt und extrahiert (**KB-1** und **LB-1**), die verbleibenden gepulverten Wurzelsfeststoffe wurden weiter zuerst mit Chloroform (**KB-2** und **LB-2**), mit *n*-Butanol (**KB-3** und **LB-3**), mit Methanol (**KB-4** und **LB-4**) und zum Schluss mit heissem Wasser (80°C) extrahiert (**KB-5** und **LB-5**), siehe auch **Abb. 5-57**.

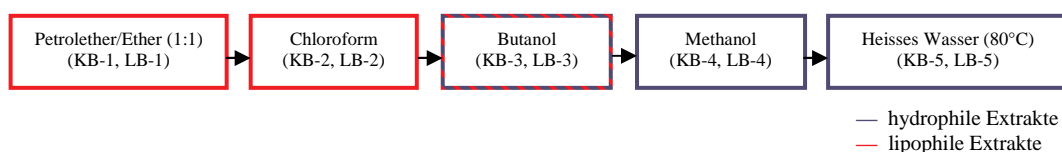


Abb. 5-57: Extraktionsmethode B zur Gewinnung der Baldrianextrakte KB-1 bis 5 bzw. LB-1 bis 5.

5.3.1.3 Extraktionsmethode C³²⁶

In einer dritten Extraktionsmethode wurden die gepulverten Baldrianwurzeln (K und L) mit heissem Wasser (80°C) extrahiert und der wässrige Extrakt nach einem Filtrations-schritt lyophilisiert, daraus resultierten die hydrophilen Heisswasser-Direktextrakte **KC-1** und **LC-1**.



Abb. 5-58: Extraktionsmethode C zur Gewinnung der Baldrianextrakte KC-1 und LC-1.

5.3.2 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien der Baldrian-Rohextrakte an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren

Die durch die in **Kapitel 5.3.1** beschriebenen Extraktionsmethoden gewonnenen Baldrian-Rohextrakte unterschiedlicher Polarität wurden zuerst auf ihre Affinität an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien getestet, die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-22** dargestellt. In den meisten Fällen zeigten sich für „Kawon“ und „Lublin“ für dieselben Extraktionsmethoden auch sehr ähnliche Ergebnisse, einzig **KA-2** und **LA-2** bilden hier eine deutliche Ausnahme, bei den lipophilen Rückextrakten der Methanol-Direktextrakte zeigte **LA-2** eine signifikant höhere Affinität zu A₁-Adenosinrezeptoren als **KA-2**.

Die Mehrheit der Extrakte zeigten keine oder nur eine sehr geringe Affinität zu A_{2A}-Adenosinrezeptoren, bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml konnte die Radioligandbindung (³H]**MSX-2**) in den meisten Fällen nicht mehr als 35% gehemmt werden (**Tab. 5-22**). Auch hier scheint jedoch der lipophile Chloroform-Rückextrakt der Methanolextraktion (**LA-2**) eine Ausnahme zu bilden, durch ihn konnte die [³H]**MSX-2**-Bindung immerhin um 57 % inhibiert werden. Auch die Extrakte **KA-1**, **LA-1** und **LB-1** zeigten im Vergleich zu den anderen Extrakten mit Werten von 32 % -34 % die vergleichsweise höchsten Affinitäten, es handelt dabei ausnahmslos um lipophile Extrakte. Es scheint also, dass in der Baldrianwurzel lipophile Inhaltsstoff(e) vorhanden sind, die eine gewisse Affinität zum A_{2A}-Adenosinrezeptor aufweisen.

Tab. 5-22: Affinitäten der Baldrian-Rohextrakte an Ratten-A₁-Adenosinrezeptoren (Cortex-Membranpräparation) und Ratten-A_{2A}-Adenosinrezeptoren (Striatum-Membranpräparation), n=3 ± SEM.

| | A₁ vs. [³H]CCPA | | A_{2A} vs. [³H]MSX-2 | |
|---------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|
| | Rattencortex | | Rattenstriatum | |
| | % Inhibition der Radioligandbindung bei 100 µg/ml (n=2) | K_i ± SEM (µg/ml) | % Inhibition der Radioligandbindung bei 100 µg/ml (n=2) | K_i ± SEM (µg/ml) |
| KA-1 | 40 ± 13 | n.d. | 33 ± 2 | n.d. |
| LA-1 | 18 ± 14 | n.d. | 34 ± 2 | n.d. |
| KA-2 | 8 ± 10 | n.d. | 20 ± 5 | n.d. |
| LA-2 | 50 ± 10 | 39.0 ± 4.0 | 57 ± 4 | n.d. |
| KA-3 | 12 ± 11 | n.d. | 11 ± 4 | n.d. |
| LA-3 | 25 ± 11 | n.d. | 11 ± 2 | n.d. |
| KA-4 | 4 ± 3 | n.d. | 4 ± 2 | n.d. |
| LA-4 | 25 ± 10 | n.d. | 15 ± 7 | n.d. |
| KA-5 | 13 ± 10 | n.d. | 10 ± 3 | n.d. |
| LA-5 | 19 ± 10 | n.d. | 4 ± 4 | n.d. |
| KB-1 | 56 ± 8 | 80.8 ± 16.0 | 25 ± 3 | n.d. |
| LB-1 | 47 ± 8 | 53.0 ± 10.0 | 32 ± 4 | n.d. |
| KB-2 | 56 ± 5 | 7.16 ± 0.02 | 21 ± 2 | n.d. |
| LB-2 | 46 ± 3 | 516 ± 43 | 17 ± 10 | n.d. |
| KB-3 | 48 ± 6 | 88.5 ± 19.0 | -2 ± 3 | n.d. |
| LB-3 | 30 ± 5 | n.d. | -3 ± 6 | n.d. |
| KB-4 | 5 ± 13 | n.d. | -11 ± 2 | n.d. |
| LB-4 | 19 ± 13 | n.d. | -7 ± 5 | n.d. |
| KB-5 | 5 ± 13 | n.d. | -14 ± 3 | n.d. |
| LB-5 | 21 ± 13 | n.d. | -14 ± 3 | n.d. |
| KA-dir | 16 ± 2 | n.d. | 2 ± 7 | n.d. |
| LA-dir | 21 ± 5 | 139 ± 18 | 0 ± 0 | n.d. |
| KC-1 | 12 ± 5 | n.d. | 2 ± 8 | n.d. |
| LC-1 | 22 ± 6 | n.d. | -6 ± 5 | n.d. |

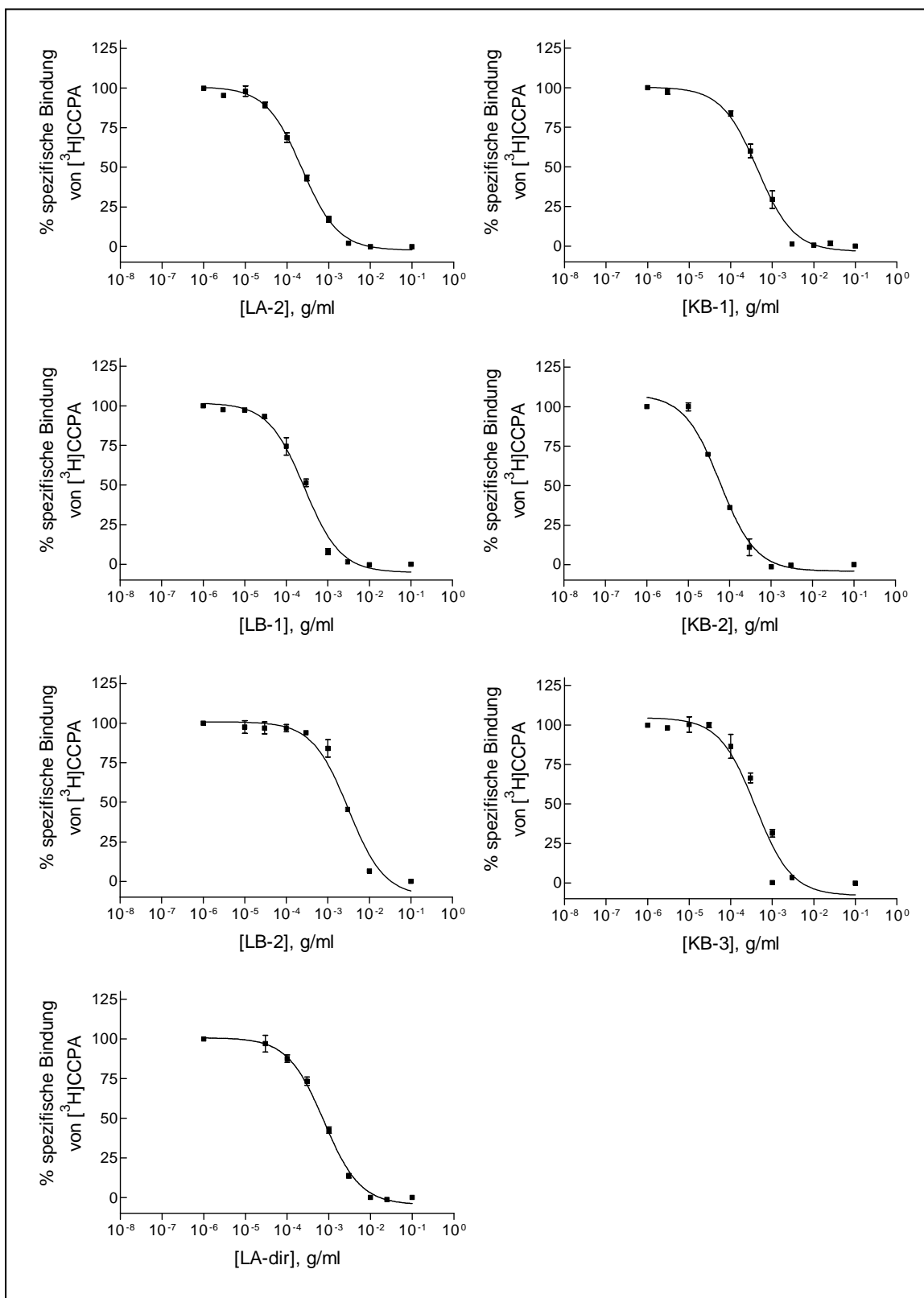


Abb. 5-59: Inhibitionskurven aus Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien ausgewählter Baldrian-Rohextrakte an A_1 -Adenosinrezeptoren (gegen $[^3\text{H}]\text{CCPA}$ in Rattenhirn-Cortex-Membranpräparationen), die Kurven sind teilweise extrapoliert, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Da wesentlich mehr Extrakte Affinitäten an A_1 -Adenosinrezeptoren zeigten, wurden diese Extrakte näher untersucht und in einem nächsten Schritt Inhibitionskurven ausge-

wählter Rohextrakte an A₁-Adenosinrezeptoren erstellt (siehe **Abb. 5-59**) sowie die daraus resultierenden K_i-Werte berechnet (siehe **Tab. 5-22**). Dabei zeigten die lipophilen Extrakte (**KB-1**, **LB-1**, **KB-2** und **LB-2** sowie der Butanol-Rückextrakt **KB-3**) K_i-Werte im Bereich zwischen 7.16 µg/ml und 516 µg/ml, während der methanolische Direktextrakt **LA-dir** einen K_i-Wert von 139 µg/ml und der Chloroform-Rückextrakt **LA-2** einen K_i-Wert von 39 µg/ml aufweisen. Die Affinitätswerte für den methanolische Direktextrakt liegen damit in sehr guter Übereinstimmung mit vorangehenden Studien (siehe **Kapitel 5.2**).

5.3.3 [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien der Baldrian-Rohextrakte an A₁-Adenosinrezeptoren

Um die funktionellen Eigenschaften der vorliegenden Baldrianextrakte zu charakterisieren, wurden [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien mit den Baldrianextrakten, die die höchsten Affinitäten am A₁AR aufwiesen, durchgeführt. Der Extrakt **LB-2** wurde aufgrund nicht ausreichender Affinität nicht mit in die Untersuchungen aufgenommen, der Extrakt **LB-1** da er nahezu identische Affinität wie der ähnlich polare Extrakt **KB-2** zeigte. Die Versuche wurden an humanen A₁-Adenosinrezeptoren durchgeführt, die in CHO-Zellen exprimiert wurden. Theoretisch wäre es auch möglich, die Versuche an Rezeptoren in nativem Gewebe wie Rattencortexmembranen durchzuführen. Die Höhe der Effekte, vor allem invers-agonistische, sind hier jedoch erfahrungsgemäß sehr viel geringer und teilweise sogar kaum messbar, sodass im Rahmen dieser Arbeit mit den CHO-hA₁-Zellen gearbeitet wurde. Als Referenzsubstanzen wurden der A₁AR-Vollagonist N⁶-Cyclopentyladenosin (**CPA**) und der inverse Agonist mit der bislang stärksten bekannten Aktivität am A₁-Adenosinrezeptor, 1,3-Dipropyl-8-cyclopentyladenosin (**DPCPX**) mitgetestet. Die erhaltenen Daten werden alle auf die Werte von **CPA** (=100 %) normalisiert dargestellt, siehe **Abb. 5-60** und **Tab. 5-23**. **CPA** führte dabei zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung mit einem maximalen Effekt von 236 ± 25 %, n=5, bei einem EC₅₀-Wert von 0.825 nM, **DPCPX** zeigte eine Inhibition der [³⁵S]GTPγS-Bindung bis maximal 40 % unter den Basalwert bei einem EC₅₀-Wert von 2.11 nM. Während der lipophile Extrakt **KB-1** ebenfalls eine deutliche Inhibition der [³⁵S]GTPγS-Bindung bis zu 31 % unter Basalwert und damit invers agonistische Eigenschaften zeigte, erhöhten alle anderen untersuchten Extrakte die

[35 S]GTP γ S-Bindung konzentrationsabhängig. Der sehr hydrophile Methanoldirektextrakt **LA-dir** induzierte die höchste Stimulierung mit einer partialagonistischen Aktivität von bis zu 49 % des Effektes eines Vollagonisten, gefolgt von der Aktivität des moderat polaren Butanol-Extraktes **KB-3** mit 26 % maximalem Effekt. Die beiden lipophilen Chloroformextrakte **LA-2** und **KB-2** zeigten die geringsten partialagonistischen Eigenschaften mit 21 % bzw. 8 % maximalem Effekt. Es lässt sich also eindeutig eine Abhängigkeit zwischen Polarität und intrinsischer Aktivität der Baldrianextrakte postulieren. Die Effekte reichen dabei von eindeutig partialagonistisch für hydrophile Extrakte bis invers agonistisch für lipophile Extrakte. In **Tab. 5-23** sind zusätzlich die EC_{50} -Werte aus den [35 S]GTP γ S-Bindungskurven dargestellt, die Werte korrelieren einigermaßen gut mit den aus den Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien erhaltenen K_i -Werten am A_1 -Adenosinrezeptor.

Wie in **Abb. 5-61** deutlich erkennbar, konnten die agonistischen Effekte der Baldrianextrakte **LA-dir**, **LA-2**, **KB-2** und **KB-3** durch Zugabe einer hohen Konzentration (100 nM) des A_1 -selektiven inversen Agonisten **DPCPX** sowie der invers agonistische Effekt des Extraktes **KB-1** durch Zugabe einer hohen Konzentration (100 nM) des A_1 -selektiven Agonisten **CPA** komplett geblockt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte der Extrakte eindeutig A_1 -Adenosinrezeptor-vermittelte Effekte darstellen.

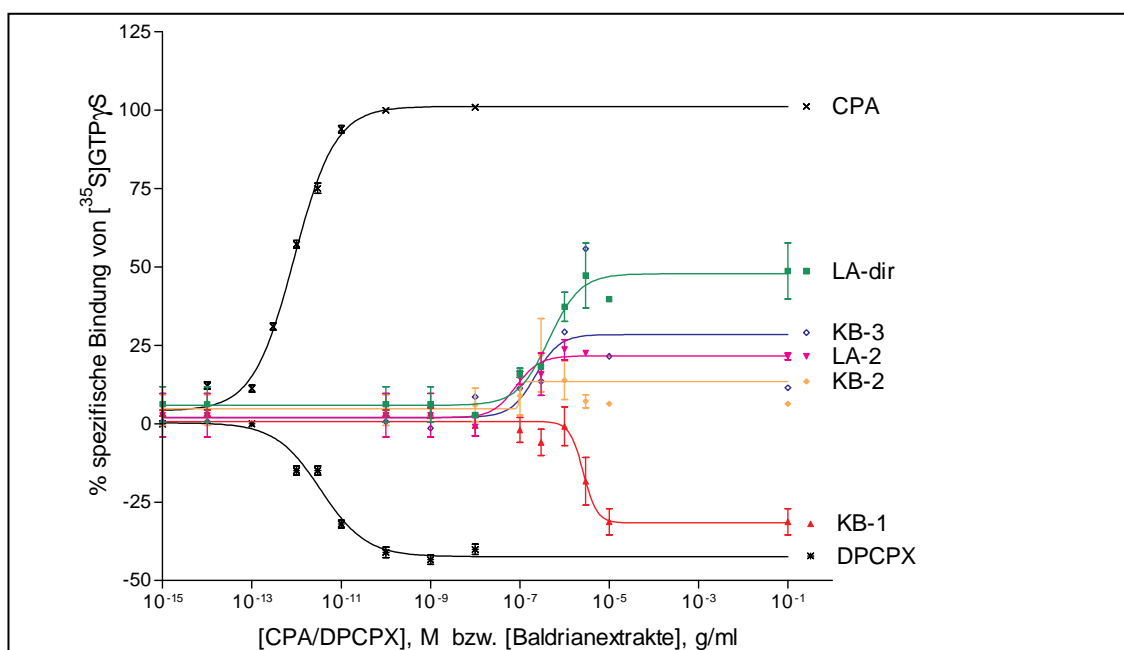


Abb. 5-60: [35 S]GTP γ S-Bindungsexperiment an humanen rekombinanten A_1 -Adenosinrezeptoren. Die Daten sind normalisiert auf den Vollagonist CPA als 100 % maximale Stimulierung dargestellt, $n=3 \pm$ SEM.

Tab. 5-23: Affinitäten der Baldrianextrakte an Ratten-A₁-Adenosinrezeptoren (Cortex-Membranpräparation) und funktionelle Charakterisierung an humanen A₁AR mittels [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien. Dargestellt sind EC₅₀-Werte und % maximale Stimulierung im Vergleich zu dem maximalen Effekt des Vollagonisten CPA (=100%), n=3 ± SEM.

| | A ₁ vs. [³ H]CCPA Rattencortex | [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an CHO-hA ₁ | |
|---------------|--|---|---|
| | K _i ± SEM (μg/ml) | EC ₅₀ ± SEM (μg/ml) | % max. Stimulierung bezogen auf den max. Effekt des Vollago- nisten CPA (=100 %) |
| CPA | 0.32 nM ⁷² | 0.852 ± 0.611 nM | 100 |
| DPCPX | 0.90 nM | 2.11 ± 0.24 nM | -40 ± 2 |
| LA-dir | 139 ± 18 | 489 ± 202 | 49 ± 9 |
| LA-2 | 39.0 ± 4.0 | 60 ± 36 | 21 ± 1 |
| KB-1 | 80.8 ± 16.0 | 319 ± 55 | -31 ± 4 |
| KB-2 | 7.16 ± 0.02 | 119 ± 108 | 8 ± 2 |
| KB-3 | 88.5 ± 19.0 | 453 ± 431 | 26 ± 2 |

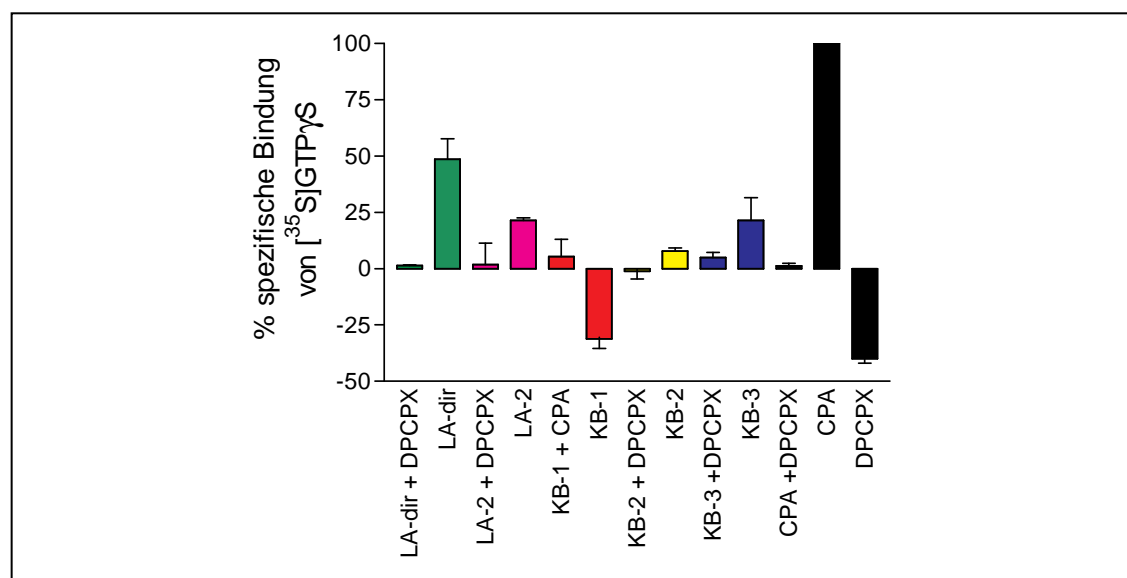


Abb. 5-61: [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment an humanen rekombinanten A₁-Adenosinrezeptoren in An-/Abwesenheit einer hohen Konzentration (100 nM) von DPCPX (A₁AR Antagonist) oder CPA (A₁AR Agonist). Die Extrakte sind bei einer Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt, die beiden Balken von DPCPX bzw. CPA alleine sind bei einer Konzentration von jew. 10 μM aufgenommen, n=3 ± SEM.

5.3.4 Bioassay-geführte Fraktionierung des Extraktes **KL-B-1**

Wie schon mehrfach erwähnt, konnten Schumacher *et al.* als ein wirksames Prinzip alkoholischer, hydrophiler Baldrianextrakte das Lignan 4'-O- β -D-Glycosyl-9-O-(6''-desoxysaccharosyl)olivil als Partialagonist am A₁-Adenosinrezeptor identifizieren.¹⁵¹ Deshalb sollte der Fokus dieser Arbeit auf die invers agonistische Aktivität des lipophilen Petrolether/Diethylether-Extraktes (**KB-1**) gelegt werden. Um auch hier die aktive Komponente identifizieren zu können, wurde der Extrakt durch eine Fraktionierung weiter aufgetrennt. Da beide Ausgangssorten „Kawon“ und „Lublin“ nahezu identische Rezeptoraffinitäten aufwiesen (K_i der Extrakte **KB-1** und **LB-1** am A₁AR: $80.0 \pm 16.0 \mu\text{g/ml}$ bzw. $53.0 \pm 10.0 \mu\text{g/ml}$, siehe **Tab. 5-22**) wurde für die weitere Isolierung aktiver Komponenten die beiden Extrakte vereint und eine Mischung der Extrakte beider Sorten, genannt **KL-B-1**, verwendet. Dieser Petrolether/Diethylether-Extrakt wurde zuerst über eine Sephadex LH-20-Säule nach Molekülgröße weiter aufgetrennt.³²⁶ Nach einer Elution mit Methanol konnten acht Unterfraktionen – genannt **KL-B-1-I** bis **VIII** – aufgrund ihrer Eigenschaften während einer Dünnschichtchromatographie (DC) (UV-Detektion bei 254 nm und Besprühen mit Cer-IV-Sulfat) gewonnen werden. Diese Fraktionen wurden in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien auf ihre Affinität an A₁AR untersucht, die Fraktionen mit den höchsten Affinitäten wurden wiederum zusätzlich in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien eingesetzt, um ihre funktionellen Charakteristiken an diesem Rezeptorsubtyp zu identifizieren. Die Ergebnisse sind in **Tab. 5-24** und **Abb. 5-62** dargestellt. Dabei zeigten die Fraktionen **III**, **V**, **VI** und **VII** die höchsten Affinitäten (K_i -Werte zwischen $6.95 \mu\text{g/ml}$ und $10.0 \mu\text{g/ml}$) und besaßen alle erwartungsgemäß invers agonistische Eigenschaften, dies jedoch mit unterschiedlichen maximalen Effekten. Den stärksten Effekt zeigte Fraktion **KL-B-1-III**, im Vergleich mit **DPCPX** zeigte sich diese Fraktion als voller inverser Agonist am A₁AR (**Abb. 5-62**) mit einem maximalen Effekt von -48% und einem EC₅₀-Wert von $11.4 \mu\text{g/ml}$ bei einem K_i -Wert von $9.83 \mu\text{g/ml}$. Die Fraktionen **V** – **VII** inhibierten die [³⁵S]GTP γ S-Bindung nur partial um 26 % bis 34 % bei EC₅₀-Werten von $50 \mu\text{g/ml}$ (**VI**) bis $272 \mu\text{g/ml}$ (**V**) Extraktkonzentration. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Fraktion **KL-B-1-III** weiter in Unterfraktionen aufgetrennt. Dies geschah säulenchromatographisch über eine Kieselgelsäule,³²⁶ wodurch wiederum acht Unterfraktionen, genannt **KL-B-1-III-A** bis **H** erhalten werden konnten.

Tab. 5-24: Affinitäten der Fraktionen KL-B-1-I bis VIII an Ratten-A₁-Adenosinrezeptoren (Cortex-Membranpräparation) und funktionelle Charakterisierung an humanen A₁AR mittels [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien. Dargestellt sind EC₅₀-Werte und % maximale Stimulierung im Vergleich zu dem maximalen Effekt des Vollagonisten CPA (=100%), n=3 ± SEM.

| KL-B-1-Fraktion | A ₁ vs. [³ H]CCPA Rattencortex | [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an CHO-hA ₁ | |
|-----------------|--|---|--|
| | K _i ± SEM (μg/ml) | EC ₅₀ ± SEM (μg/ml) | % max. Stimulierung bezogen auf den max. Effekt des Vollagonisten CPA (=100 %) |
| I | 194 ± 106 | n.d. | n.d. |
| II | 26.0 ± 4.0 | n.d. | n.d. |
| III | 9.83 ± 0.48 | 11.4 ± 3.4 | -48 ± 13 |
| IV | 29.1 ± 2.2 | n.d. | n.d. |
| V | 9.65 ± 3.86 | 272 ± 84 | -26 ± 2 |
| VI | 6.96 ± 0.15 | 50.0 ± 4.3 | -34 ± 11 |
| VII | 10.0 ± 0.8 | 106 ± 4 | -33 ± 3 |
| VIII | 30.8 ± 6.8 | n.d. | n.d. |

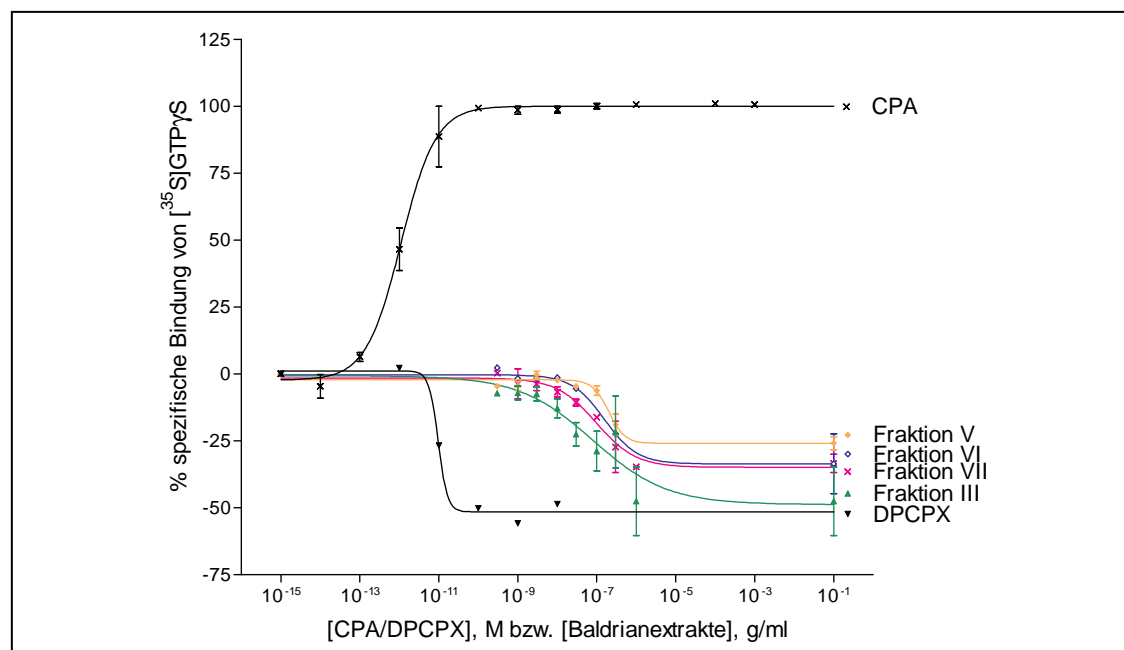


Abb. 5-62: [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment der Baldrianextrakte KL-B-1-I bis VIII an humanen rekombinanten A₁-Adenosinrezeptoren, die Daten sind normalisiert auf den Vollagonist CPA als 100% maximale Stimulierung dargestellt, n=3 ± SEM.

Um einen Überblick über diese acht neu erhaltenen Unterfraktionen **KL-B-1-III-A** bis **H** zu erhalten, wurde ein Screening mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Ratten-A₁- und -A_{2A}-Adenosinrezeptoren durchgeführt, die Fraktionen wurden dabei in einer Konzentration von 100 µg/ml getestet und die Inhibition der Radioligandbindung (³H]CCPA an A₁AR bzw. [³H]MSX-2 an A_{2A}AR) bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 5-25** dargestellt.

Tab. 5-25: Affinitäten der Fraktionen KL-B-1-III-A bis H an Ratten-A₁-Adenosinrezeptoren (Cortex-Membranpräparation) und an Ratten-A_{2A}-Adenosinrezeptoren (Striatum-Membranpräparation), n=3 ± SEM.

| KL-B-1-III-Fraktion | % Inhibition der Radioligand-Bindung bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml | |
|---------------------|--|--|
| | A ₁ vs. [³ H]CCPA Rattencortex | A _{2A} vs. [³ H]MSX-2 Rattenstriatum |
| Gemisch A-H | 61 ± 2 | 20 ± 2 |
| A | -4 ± 4 | 19 ± 6 |
| B | 18 ± 7 | 9 ± 1 |
| C | 17 ± 13 | 20 ± 7 |
| D | 70 ± 8 | 51 ± 0 |
| E | 51 ± 2 | 15 ± 9 |
| F | 38 ± 4 | 30 ± 4 |
| G | 20 ± 1 | 23 ± 3 |
| H | 24 ± 4 | 21 ± 8 |

Bei einer Testkonzentration von 100 µg/ml war Fraktion **KL-B-1-III-D** diejenige mit der höchsten Affinität an den beiden untersuchten Adenosinrezeptoren mit Inhibitions-werten von 70 % (A₁) bzw. 51 % (A_{2A}). Alle anderen Fraktionen zeigten eine Inhibition der Radioligand-Bindungen von 50 % und waren damit für weitere Untersuchungen uninteressant. Fraktion **KL-B-1-III-D** konnte wiederum erneut säulenchroma-tographisch über eine Kieselgelsäule in zwei Unterfraktionen aufgetrennt werden,³²⁶ **KL-B-1-III-D-a** und **b**, welche in Radioligand- bzw. [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien auf ihre Affinität und funktionelle Aktivität an A₁-Adenosinrezeptoren untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in **Tab. 5-26** dargestellt. Dabei konnte die höhere Affinität an A₁-Adenosinrezeptoren für Fraktion **KL-B-1-III-D-b** identifiziert werden, mit einem K_i-

Wert von $1.29 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$. In einem letzten Schritt wurde diese Fraktion dann nochmals über eine Kieselgelsäule aufgereinigt, die daraus resultierende Substanz zeigte potente invers agonistische Eigenschaften in Höhe der Aktivität von **DPCPX**, dem am höchsten potenten inversen Agonisten am A_1 -Adenosinrezeptor, der bislang identifiziert werden konnte (siehe auch **Abb. 5-63**). Der K_i -Wert des aufgereinigten fraktionierten Extraktes lag bei $0.865 \mu\text{g/ml}$, was einem Wert von $2.05 \mu\text{M}$ für **Isovaltrat** entspricht, der funktionelle EC_{50} -Wert wurde in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien mit $1.94 \mu\text{g/ml}$ bestimmt und korreliert daher sehr gut mit dem Affinitätswert.

Tab. 5-26: Affinitäten der Fraktionen KL-B-1-III-D-a und b an Ratten- A_1 -Adenosinrezeptoren (Cortex-Membranpräparation) und funktionelle Charakterisierung an humanen $A_1\text{AR}$ mittels $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien. Dargestellt sind EC_{50} -Werte und % maximale Stimulierung im Vergleich zu dem maximalen Effekt des Vollagonisten CPA (=100%), $n=3 \pm \text{SEM}$.

| KL-B-1-III-D-Fraktion | A ₁ vs. [³ H]CCPA Rattencortex | | [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an CHO-hA ₁ | |
|-----------------------|--|---------------------------------|---|---|
| | % Inhibition der RL-Bdg. (100 μg/ml) | K _i ± SEM (μg/ml) | EC ₅₀ ± SEM (μg/ml) | % max. Stimulie- rung bezogen auf den max. Effekt von CPA (=100 %) |
| a | 9 ± 7 | n.d. | n.d. | n.d. |
| b | 70 ± 2 | 1.29 ± 0.18 | n.d. | n.d. |
| b aufgereinigt | 71 ± 2 | 0.865 ± 0.131 = | 1.94 ± 0.40 | -56 ± 2 |
| (Isovaltrat) | | 2.05 ± 0.31 μM | | |
| Coffein | n.d. | 44 μM | n.d. | n.d. |

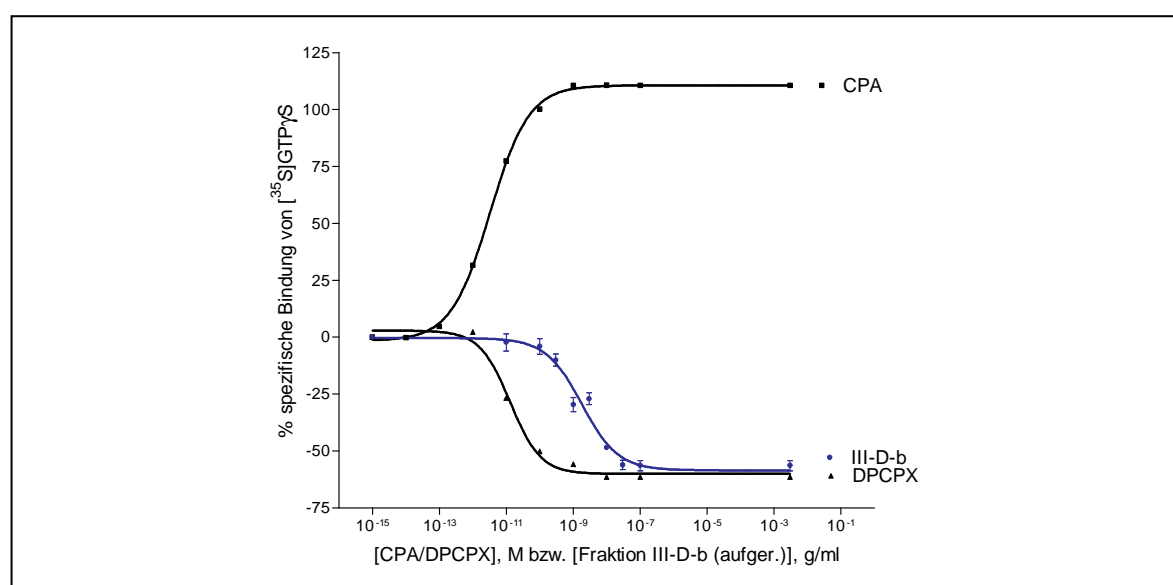


Abb. 5-63: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperiment des fraktionierten, aufgereinigten Extraktes KL-B-1-III-D-b (identifiziert als Isovaltrat) an humanen rekombinanten A_1 -Adenosinrezeptoren, $n=3 \pm \text{SEM}$.

Die Struktur der aus dem Baldrianextrakt gewonnenen Substanz konnte mittels Massenspektrometrie (MS) und 2D NMR-Experimenten (COSY, HSQC; HMBC)^{326,327} aufgeklärt werden. Bei der Substanz handelt es sich um das von Thies bereits 1967 erstmals beschriebene **Isovaltrat**,³²⁸ einem seit langem bekannten, lipophilen Inhaltsstoff des Baldrians (siehe **Abb. 5-64**).

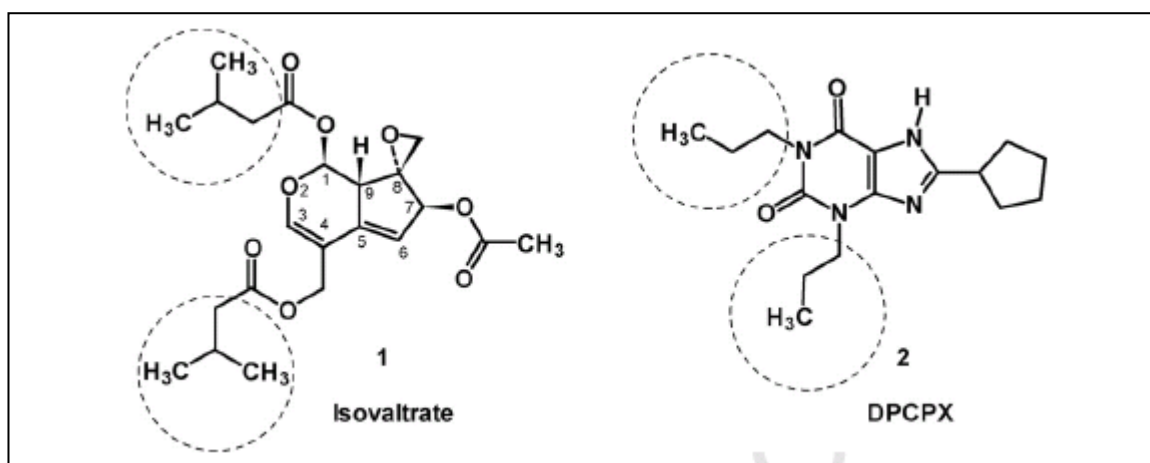


Abb. 5-64: Struktureller Vergleich der inversen Agonisten am A₁-Adenosinrezeptor, Isovaltrat (1) und DPCPX (2). Beide Moleküle enthalten zwei lipophile Domänen, die von Alkylgruppen (Kreise) besetzt sind.

Vergleicht man die chemischen Strukturen der beiden inversen Vollagonisten am A₁-Adenosinrezeptor, **Isovaltrat** und **DPCPX**, finden sich einige Übereinstimmungen (siehe **Abb. 5-64**). Beide Verbindungen enthalten ein 6:5-bizyklisches Grundgerüst, im Fall von **DPCPX** ein quasi flaches Purin-Ringsystem, während es sich bei **Isovaltrat** um eine teilweise Wasserstoff-gesättigte, nicht planare Cyclopenta[*c*]-pyran-Struktur handelt. Beide Strukturen besitzen Alkyl-Seitenketten – Propyl bei **DPCPX** und Isobutyl als Teil der Isopentanoyl-ester in **Isovaltrat** – sowie zu Wasserstoffbrückenbindungen fähige Komponenten wie z.B. die C2- und C6-Carbonylgruppen in **DPCPX** bzw. die Estergruppen in **Isovaltrat**.

In einer weiterführenden Untersuchung zu den pharmakologischen Eigenschaften von **Isovaltrat** konnte von Frau Prof. Dr. K. Nieber und Mitarbeitern, Pharmazeutisches Institut der Universität Leipzig, gezeigt werden, dass **Isovaltrat** in der Lage ist, die durch den Vollagonisten am A₁AR, N⁶-Cyclopentyladenosin (**CPA**), ausgelöste Inhibition von postsynaptischen Potentialen (PSPs) in Neuronen des Rattencortex zu verringern.³²⁶ Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass **Isovaltrat** stimulatorische Effekte

auf das zentrale Nervensystem über eine Blockade von tonisch aktivierten A_1 -Adenosinrezeptoren ausübt.

5.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Nachdem in mehreren vorangehenden Studien – u.a. im Rahmen dieser Arbeit – gezeigt werden konnte, dass hydrophile Baldrianextrakte Affinität zu A_1 -Adenosinrezeptoren aufweisen und dabei partial-agonistische Aktivität besitzen (siehe **Kapitel 5.2**), konnte das Lignan-Glykosid 4'- O - β -D-Glycosyl-9- O -(6''-desoxysaccharosyl)olivil identifiziert werden, welches eine der aktiven Komponenten dieser Extrakte darstellt und möglicherweise zu den beobachteten Effekten beiträgt.¹⁵¹ Daraufhin wurden im Rahmen der hier vorliegenden Studie Baldrianextrakte mit einer weiten Polaritätsspanne untersucht, von sehr polaren Extrakten bis zu extrem lipophilen Extrakten. Dabei konnte gezeigt werden, dass mehrere Inhaltsstoffe von Baldrian – sowohl lipophile als auch hydrophile – mit A_1 -Adenosinrezeptoren interagieren. Die meisten der untersuchten Extrakte zeigten dabei hohe Selektivitäten für A_1 - im Vergleich mit A_{2A} -Adenosinrezeptoren. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass nicht ausschliesslich hydrophile, sondern ebenfalls lipophile Baldrianextrakte Affinitäten zu A_1 AR zeigen, wobei hydrophile Extrakte partialagonistische Eigenschaften besitzen. Je lipophiler der Extrakt jedoch ist, desto weiter verschiebt sich auch sein funktioneller Charakter in Richtung Antagonismus bzw. inverser Agonismus. Die EC_{50} -Werte aus funktionellen [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien korrelierten in vielen Fällen sehr gut mit den Affinitätswerten (K_i -Werten), so z.B. für die Extrakte **LA-dir**, **LA-2** und **KL-B-1-III**, für die weniger aktiven Fraktionen wie z.B. für **KB-2** oder **KL-B-1-V–VII** zeigten sich jedoch mehr oder weniger deutliche Abweichungen der K_i -Werte im Vergleich zu den EC_{50} -Werten. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Extrakte eine Mischung aus invers agonistisch, neutral antagonistisch und/oder agonistisch wirksamen Inhaltsstoffen darstellen, was alles in allem in einem reduzierten Effekt sichtbar wird. Eine weitere Möglichkeit wären die Unterschiede der beiden Spezies Ratte und Mensch, da die Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Rattencortex-Membranpräparationen durchgeführt wurden, während die funktionellen [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien an humanen A_1 -Adenosinrezeptoren exprimiert auf CHO-Zellen getestet wurden.

Die Bioassay-geführte Fraktionierung des lipophilen Extraktes **KL-B-1** führte schließlich zu der Isolierung einer Substanz, die spektrometrisch als **Isovaltrat** identifiziert werden konnte. **Isovaltrat** besitzt einen K_i -Wert von 2.05 μM am Ratten- $A_1\text{AR}$ und ist deshalb 21-fach potenter als **Coffein** mit einem K_i -Wert von 44 μM ,³²⁹ einem weiteren Naturprodukt mit nicht-selektiven, antagonistischen Eigenschaften an Adenosinrezeptoren. Im Vergleich zu **Coffein**, das keine invers agonistischen Effekte zeigt, ist **Isovaltrat** ein voller inverser Agonist mit vergleichbarer intrinsischer Aktivität wie **DPCPX**. Aufgrund dieser Ergebnisse kann postuliert werden, dass lipophile Bestandteile von Baldrian den gewünschten sedierenden Eigenschaften entgegenwirken könnten und es deshalb Sinn macht, ausschließlich hydrophile Extrakte für schlaffördernde, sedative Therapien einzusetzen. Nichtsdestotrotz scheint es unerlässlich, diese *in vitro* beobachteten Effekte auch *in vivo* auf ihre pharmakologische Relevanz zu untersuchen. Darüber hinaus kann **Isovaltrat** als neue Leitstruktur für die Entwicklung von inversen Agonisten am A_1 -Adenosinrezeptor dienen. Zukünftig sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersuchten Extrakte/Fractionen, die ebenfalls Affinitäten an A_1 - bzw. A_{2A} -Adenosinrezeptoren zeigten, genauer zu charakterisieren.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Adenosinrezeptoren sind im Körper weit verbreitet und an einer Vielzahl physiologischer Funktionen beteiligt, unter anderem wird ihnen eine wichtige Rolle im Immunsystem zugeschrieben. Eine Beteiligung aller vier bislang bekannten Adenosinrezeptorsubtypen, A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 , wird diskutiert. Vor allem A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren sind hierbei in den letzten Jahren in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt und gelten als vielversprechende Targets für neuartige antiallergische und antiinflammatorische Arzneistofftherapien. Für die Entwicklung neuer Rezeptorliganden als potentielle neue Wirkstoffe auf diesem Gebiet ist es essentiell, die genauen physiologischen Rollen aller Adenosinrezeptorsubtypen im Detail zu kennen und zu verstehen, die bis heute nicht restlos geklärt werden konnten. Erste Anhaltspunkte bieten dabei die Untersuchung der Expressionsprofile der Rezeptorsubtypen auf den Zellen/Geweben des Immunsystems und weiterführende Untersuchungen zu den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen und der darüber vermittelten Effekte. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, ist die Entwicklung selektiver Liganden für die zu untersuchenden Rezeptoren essentiell, um sie als pharmakologische Werkzeuge einsetzen zu können.

Bei der Untersuchung der Adenosinrezeptorexpression auf humanen T-Lymphozyten konnte auf Transkriptionsebene mittels Real-time-PCR-Experimenten mRNA für alle vier Adenosinrezeptorsubtypen – allerdings in unterschiedlichen Expressionsdichten – gefunden werden. In unstimulierten, primären humanen T-Lymphozyten zeigte sich folgendes Expressionsmuster: $A_{2A} \gg A_3 > A_1 = A_{2B}$, welches sich durch Stimulierung der Zellen mit PHA folgendermaßen veränderte: $A_{2A} \gg A_1 = A_3 > A_{2B}$. Hierbei war bemerkenswert, dass die ohnehin schon starke Expression der mRNA für den A_{2A} AR durch die Stimulierung noch weiter erhöht wurde, während die mRNA-Expressionen für A_{2B} AR und A_3 AR herunterreguliert wurden. Die Ergebnisse konnten auf Proteinebene mit Hilfe von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranpräparationen und intakten Zellen nur für A_{2A} AR und A_{2B} AR bestätigt werden. In unstimulierten Zellen konnte eine Rezeptorexpression gleicher Größenordnung für A_{2A} AR (B_{\max} von 3581 ± 2280 Bindungsstellen/Zelle) und A_{2B} AR (B_{\max} von 3240 ± 815 Bindungsstellen/Zelle) gemessen werden. Die A_{2A} AR-Expression wurde durch eine Stimulierung der Zellen um

das 3-fache auf 13588 ± 9939 Bindungsstellen/Zelle heraufreguliert, während die Expression des $A_{2B}AR$ nahezu konstant blieb (3994 ± 1343 Bindungsstellen/Zelle). Die bestimmten Affinitäten der Radioliganden zeigten, dass es sich bei $A_{2A}AR$ und $A_{2B}AR$ in primären humanen T-Lymphozyten um Rezeptoren mit einem für den jeweiligen Subtyp typischen pharmakologischen und biochemischen Profil handelt. Eine Expression von A_1AR und A_3AR konnte auf Proteinebene nicht detektiert werden. In der humanen Leukämie-Zelllinie Jurkat T konnte folgendes Expressionsmuster für Adenosinrezeptor-mRNA bestimmt werden: $A_1 = A_{2A} = A_{2B} \gg A_3$. Im Vergleich mit primären humanen T-Lymphozyten konnte eine sehr viel stärkere mRNA-Expression für A_1AR und $A_{2B}AR$ detektiert werden, während mRNA für $A_{2A}AR$ und A_3AR in Jurkat T-Zellen schwächer exprimiert wurde als in primären humanen T-Lymphozyten. Bei der Verifizierung dieser auf Transkriptionsebene generierten Daten konnte mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranpräparationen, wie schon bei primären T-Lymphozyten, auf Proteinebene nur die Expression von $A_{2A}AR$ und $A_{2B}AR$ mit B_{max} -Werten von 4.56 ± 3.65 pmol/mg Protein bzw. 75.5 ± 20.5 pmol/mg Protein detektiert werden. Eine Rezeptorproteinexpression von A_1AR und A_3AR wurde auf Proteinebene nicht gefunden. Bei der Bestimmung der Affinitäten verschiedener Adenosinrezeptorliganden zeigte sich, dass sowohl A_{2A} - als auch A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen ein deutlich verändertes pharmakologisches Profil aufweisen, mit deutlich niedrigeren Affinitäten der getesteten Liganden im Vergleich zu denselben Rezeptorsutypen exprimiert in anderen Zellen/Geweben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals postuliert, dass dies mit einer Heterodimerisierung oder -oligomerisierung von A_{2A} - mit A_{2B} -Adenosinrezeptoren in Jurkat T-Zellen zusammenhängen könnte. Die Di- bzw. Oligomerisierung in Jurkat T-Zellen könnte einen Deaktivierungsmechanismus für die beteiligten Rezeptoren darstellen, es scheint jedoch zusätzlich so zu sein, dass evtl. noch weitere Mechanismen zu den veränderten Affinitäten und Funktionalitäten beitragen. Alleinig durch eine Heterodimerisierung lassen sich die dargestellten Daten nur ungenügend erklären.

In einer weiteren Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit wurde die Calcium-Mobilisierung über Adenosinrezeptoren, vor allem über A_2 -Rezeptorsubtypen, sowohl auf Jurkat T-Zellen als auch auf primären humanen T-Lymphozyten untersucht. Für Jurkat T-Zellen konnten dabei Ergebnisse reproduziert werden die zeigen, dass beide Subtypen, also sowohl A_{2A} - als auch A_{2B} -Adenosinrezeptoren, an der Erhöhung der

intrazellulären Calciumkonzentration durch den unselektiven Adenosinrezeptoragonisten **NECA** beteiligt sind. Erstaunlicherweise konnte ein vermeintlich A_{2A} AR-vermitteltes Calciumsignal nicht nur durch selektive A_{2A} -Adenosinrezeptor-Antagonisten, sondern ebenfalls über einen selektiven Antagonisten am A_{2B} -Adenosinrezeptor (teilweise) blockiert werden. Ein plausibler Erklärungsansatz wäre auch hier die im Rahmen dieser Arbeit postulierte Rezeptordi-/oligomerisierung zwischen A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren auf Jurkat T-Zellen. Zu klären bliebe hierbei auf jeden Fall die Frage nach der G-Protein-Kopplung der Rezeptoren und den weiterführenden Signalkaskaden mit dem/den beteiligten Second messenger/n in Kombination mit der weiteren Verfolgung bzw. dem endgültigen Beweis für die postulierte Rezeptordi-/oligomerisierung. Für primäre humane T-Lymphozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit – anders als für Jurkat T-Zellen – weder ein eindeutiger **NECA**- bzw. Adenosinrezeptor-vermittelter Effekt auf die intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt werden, noch konnte eine Kopplung von Adenosinrezeptoren an intrazelluläre Calciumspeicher bzw. evtl. membranständige Calciumkanäle in diesen Zellen vollständig ausgeschlossen werden, vor allem in stimulierten Zellen. Somit bedürfen die Effekte von Adenosinrezeptoren auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in primären humanen T-Lymphozyten ebenfalls weiterer Forschungsbemühungen.

Bei der Untersuchung der Effekte, die verschiedene (subtypselektive) Adenosinrezeptorliganden auf die Proliferation humaner T-Lymphozyten ausüben, zeigte sich, dass sowohl Adenosinrezeptoragonisten (A_1 -, A_{2B} - sowie A_3 -selektiv) als auch Antagonisten (A_1 -, A_{2A} -, und A_3 -selektiv) einen deutlich hemmenden Einfluss auf die Proliferation von T-Lymphozyten besitzen, sowohl auf primäre – unstimulierte genauso wie PHA-stimulierte Zellen – als auch auf Jurkat T-Zellen. Die Ergebnisse deuten auf einen Rezeptor-unabhängigen, zytotoxischen Effekt der Substanzen hin. Das Enzym **ADA** zeigte erwartungsgemäß einen stimulierenden Effekt auf unstimulierte primäre Zellen, was die These der T-Zell-vermittelten immunsuppressiven Wirkung von endogenem Adenosin untermauert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass DMSO-Konzentrationen größer als 0.1% Einfluß auf Zellfunktionen und Viabilität nehmen. Weitergehende Versuche scheinen unerlässlich, die genauen Mechanismen der Proliferationshemmung durch die verschiedenen Adenosinrezeptorliganden, Agonisten wie auch Antagonisten, zu klären.

Da es für die weitere Charakterisierung von Adenosinrezeptoren, deren Expressionsdichten und der gekoppelten Signaltransduktionskaskaden unerlässlich ist, auf ein breites Spektrum an pharmakologischen Werkzeugen zurückgreifen zu können, sollte in einem weiteren Teil-Projekt dieser Arbeit versucht werden, neue Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Adenosinrezeptorliganden aus Baldrian-Pflanzenextrakten abzuleiten. Dafür wurde die Interaktion von Baldrianextrakten unterschiedlicher Polarität mit Adenosinrezeptoren untersucht. Es konnten Ergebnisse reproduziert werden, die zeigen, dass hydrophile Baldrianextrakte Affinität an A_1 -Adenosinrezeptoren aufweisen und dabei partialagonistische Aktivität besitzen. Daraufhin wurden Baldrianextrakte mit einer weiten Polaritätsspanne untersucht, von sehr polaren Extrakten bis zu extrem lipophilen Extrakten. Dabei interagierten mehrere Inhaltsstoffe von Baldrian – sowohl lipophile als auch hydrophile – mit A_1 -Adenosinrezeptoren, die meisten der untersuchten Extrakte wiesen dabei hohe Selektivitäten für A_1 - im Vergleich zu A_{2A} -Adenosinrezeptoren auf. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass nicht ausschliesslich hydrophile, sondern auch lipophile Baldrianextrakte Affinität zu A_1 AR zeigen, wobei hydrophile Extrakte partialagonistische Eigenschaften besitzen. Je lipophiler der Extrakt jedoch ist, desto weiter verschiebt sich auch sein funktioneller Charakter in Richtung Antagonismus bzw. inversem Agonismus. Die Bioassay-geführte Fraktionierung eines lipophilen Extraktes führte schliesslich zur Isolierung einer Substanz, die spektroskopisch als **Isovaltrat** identifiziert werden konnte.

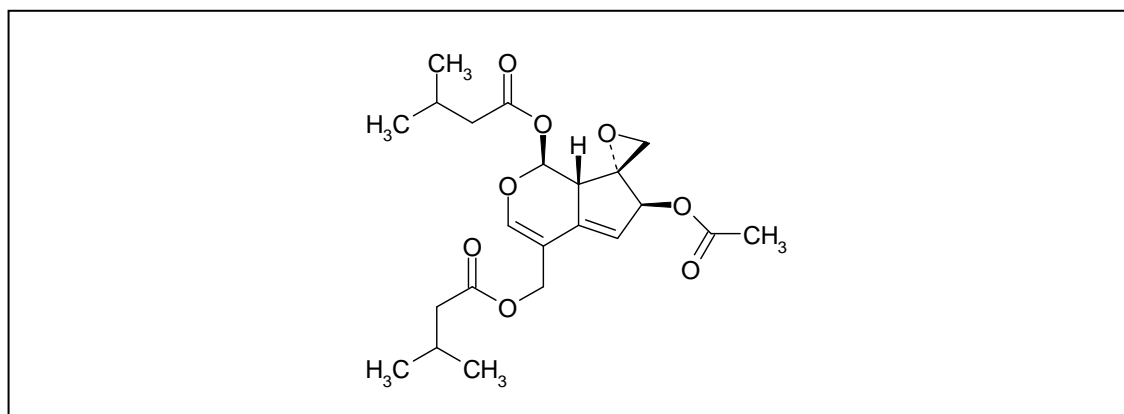


Abb. Chemische Struktur von Isovaltrat.

Isovaltrat besitzt einen K_i -Wert von 2.05 μ M an Ratten- A_1 AR, ist ein voller inverser Agonist mit vergleichbarer Aktivität wie **DPCPX** und kann deshalb als neue Leitstruktur für die Entwicklung von inversen Agonisten am A_1 -Adenosinrezeptor dienen. Zukünftige Untersuchungen sollten klären, ob weitere Verbindungen aus den bisher noch

nicht analysierten Extrakten/Fraktionen mit Affinität zu A_1 - bzw. A_{2A} -Adenosinrezeptoren isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden können.

In den genannten Teilprojekten der vorliegenden Arbeit ist es somit gelungen, die Adenosinrezeptorexpression auf humanen Lymphozyten, die nachgeschalteten Signaltransduktionswege und die daraus resultierenden Effekte auf die Physiologie dieser Zellen genauer zu untersuchen. Dabei konnte erstmals postuliert werden, dass A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren auf Jurkat T-Zellen Heteromere bilden, was die Pharmakologie dieser Rezeptoren signifikant beeinflusst. Zusätzlich konnte mit **Isovaltrat** eine neue Leitstruktur für die Entwicklung neuartiger inverser Agonisten am A_1 -Adenosinrezeptor aus einem lipophilen Baldrianextrakt identifiziert werden.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Angaben

7.1.1 Geräte und Materialien

| | |
|-----------------------------|---|
| Analysenwaage | Sartorius CP225D |
| Autoklaven | Varioklav [®] Dampfsterilisator, H+P Systec 3850 ELV, Tuttnauer |
| Bakterienschüttler | Innova 4200 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA |
| Brutschränke | Jouan IG 650 Heraeus HERAcell [®] 240 |
| Dispensette | Brand Dispensette III, 0.2-2.0 ml |
| Durchfluscytometer | FACS Canto II, Becton Dickinson (BD) |
| Einmalpipetten, serologisch | Costar [®] Stripette, Sarstedt |
| FACS Röhrchen | Polystren 12/75 mm, BD und Sarstedt |
| Falcon Tubes | Greiner bio-one, Sarstedt (15 ml und 50 ml, steril) |
| Filteraufsätze für Spritzen | Rotilabo [®] -Spritzenfilter, 0.22 µM, Roth P644.1 |
| Fluorimeter | Fluostar Galaxy [®] , bmg Labtech |
| Glasfaserfilter | 24er Harvester: Whatman [®] , Schleicher und Schüll GF/B und GF/C 48er Harvester: Whatman [®] , Schleicher und Schüll GF/B und GF/C 96er Harvester: Uni-Filter [®] -96, Perkin Elmer GF/B und GF/C |
| Harvester | Brandel M24, Gaithersburg MD, USA Brandel M48, Gaithersburg MD, USA Brandel 96, Gaithersburg MD, USA |
| Heizblock | Thermomixer comfort, Eppendorf |
| Heizplatte mit Magnetrührer | RCT basic, IKA Labortechnik |
| Homogenisator | RW 16 basic, IKA Labortechnik |

| | |
|---------------------------------|--|
| Kryovials, steril | Greiner bio-one, Sarstedt |
| Liquid Scintillation Counter | TRICARB [®] 2900TR, Canberra Packard TopCount [®] NXT, Packard |
| LSC-Cocktail | UltimaGold [™] , Canberra Packard Ready Safe [™] , Beckman Coulter |
| Maxivials | Roth |
| Mikroskope | Axiovert 25, Zeiss Wilovert AFL, Hund |
| Mikrotiterplatten | Microtest Plate 96, Sarstedt |
| Multipette | Eppendorf Multipette [®] Plus |
| Minivials C | Roth |
| Objektträger | 76 x 26 mm, Menzel-Gläser |
| PE-Vials | Polyethylenvials, 4 ml und 5 ml, Roth |
| Pipetten | Eppendorf research |
| Pipettenspitzen | Greiner Plastibrand [®] Brand; Sarstedt |
| Pipettenspitzen für Multipetten | Ritips [®] professional, Ritter |
| pH-Meter | WTW pH Elektrode SenTix 41 WTW pH 197 |
| Photometer | DU [®] 530, Beckmann |
| Realtime PCR-Thermocycler | iCycler iQ [™] , BioRad iQ [™] 5, BioRad |
| Realtime PCR, 96-Wellplatten | 96 well Multiply [®] -PCR Platte |
| Safe-Lock Reaktionsgefäße | Eppendorf |
| Schüttelwasserbad | GFL [®] 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH |
| Sicherheitswerkbänke | NUNC [®] Safe flow 1.2 NUNC [®] BIOFLOW |
| Siegelfolien | TopSeal [®] : 96-Well Microplates, Perkin Elmer (Mikro- titerplatten) Sarstedt 95.1994 (Real-time-PCR) |
| Software | GraphPad Prism [®] , Version 3.0 und 4.0 Isis [™] Draw 2.4 Microsoft Office Programme, Version 2003 Gene Expression Analysis for iCycler iQ [®] , BioRad FACS Diva 6, BD Flowjo 4.4.1, TreeStar Inc. |

| | |
|----------------------------|---|
| Spritzen, steril | Braun |
| Ultraschallbad | RK110H und RK52H, Bandelin Sonorex |
| Ultraturrax | T25 basic, IKA Labortechnik |
| UV-Lampe | CAMAG |
| Vortex | MS 2 Minishaker, IKA Labortechnik |
| Waage | Scaltec SBC42 |
| Zählkammer | Neubauer-Improved, REF 0640030 |
| Zellkulturflaschen | Greiner bio-one, Sarstedt |
| Zellkulturschalen (Dishes) | Greiner bio-one, Sarstedt |
| Zentrifugen | Beckman Avanti™, J-20XP und J-20I Beckman Allegra™, 2IR BIOFUGE pico, Heraeus |
| Zentrifugenröhrchen | Beckman Centrifuge Tubes (29 x 104 mm, 50 ml) |

7.1.2 Chemikalien

Käuflich erworbene Chemikalien

| | |
|--|--------------------------------|
| ADA | Calbiochem 116880, Fluka 01898 |
| ADP | Sigma, A-5285 |
| ATP | Applichem, A1348 |
| BSA, Albumin Fraktion V | Roth, 8076 |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | Fluka, 21097 |
| CADO | Sigma, C-5134 |
| CFSE | Molecular Probes |
| CGS-21680 | Tocris, 1063 |
| Coffein | Sigma, C-8960 |
| CPA | Sigma, F-8031 |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | Applichem, A1034 |
| DMSO | Roth, 4720 |
| DMSO, steril für die Zellkultur | Applichem, A3672 |
| DPCPX | Tocris, 0439 |
| DTT | Applichem, A1101 |

| | |
|---|---|
| EDTA | Roth, 8040 |
| EDTA-Lösung, 0.5 M | Sigma, E-7889 |
| EGTA | Roth, 3054 |
| Ethanol, p.A. | Merck, 1.00983 |
| Ethanol, technisch | ZVE |
| Folin-Reagenz | Sigma, F-9252 |
| G418 | Merck 345810, Gibco 11811-064 |
| GDP | Applichem, A3767 |
| D-Glucose (wasserfrei) | Sigma, G-7021 |
| GTP γ S | Sigma, G-8634 |
| HCl (37%) | Riedel-de Häen, 30721 |
| HEPES | Sigma, H-3375 |
| IB-MECA | Tocris, 1066 |
| iQ TM SYBR [®] Green Supermix | BioRad, 170-8882 |
| Isopropanol, technisch | ZVE |
| KCl | Fluka, 60128 |
| KH ₂ PO ₄ | Sigma, P-9791 |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | Fluka, 63068 |
| MgSO ₄ | Sigma, M-2643 |
| NaCl | Grüssing, 12264 |
| Na ₂ CO ₃ | Applichem, A1881 |
| NaOH, Plätzchen | Chem ^{solute} |
| Na ₂ HPO ₄ | Applichem, A1046 |
| Na-Tartrat | Applichem, A2662 |
| NECA | Sigma, E-2387 |
| Oregon Green [®] 488 Bapta-1 AM | Molecular Probes |
| Pancoll, human | PANbiotech, P04-60500 |
| PHA | Sigma, L-8902 |
| Phenolrot (0.5%) | Sigma, P-0290 |
| Polyethylenimin-Lösung (50%) | Sigma, P-3143 |
| Pluronic [®] F-127 | Sigma, P-2443 |
| PMSF | Fluka, 78830 |
| Primer | Synthese durch Invitrogen, „Invitrogen Custom Primers“ |
| R-PIA | Sigma, P-4532 |

| | |
|--|-------------------|
| D(+)-Saccharose | Roth, 4621 |
| SYBR [®] GreenER [™] qPCR SuperMix | Invitrogen, 11761 |
| Tricin | Sigma, T-5816 |
| Tris | Applichem, A1086 |
| Trypan-blau (0.4%) | Sigma, T-8154 |
| UDP | Applichem, A3852 |
| UTP | Applichem, A2237 |
| ZM241385 | Tocris, 1036 |

Nicht kommerziell bezogene Chemikalien

| | |
|----------|--------------------------------------|
| Coffein | Synthese im AK Prof. Dr. C.E. Müller |
| MSX-2 | |
| PSB-10 | |
| PSB-36 | |
| PSB-603 | |
| PSB-1115 | |

| | |
|-------------------|---|
| Baldrian Extrakte | Extrahiert im AK Prof. Dr. C.E. Müller durch Dr. Ralf Mayer |
| | Extrahiert im AK Prof. Dr. H. Häberlein, Institut für physiologische Chemie der Universität Bonn |
| | Bereitgestellt durch Finzelberg GmbH & Co. KG, D-Andernach |
| | Bereitgestellt durch Zeller AG, CH-Romanshorn |
| | Bereitgestellt durch Dr. Koetter Consulting Services, CH-Uttwil |
| | |

7.1.3 Reaktionskits

Alle Reaktionskits werden nach Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet

| Bezeichnung des Reaktionskits | Hersteller |
|---|------------------------|
| NucleoSpin [®] RNAII | Macherey-Nagel, 740955 |
| Dynabeads [®] mRNA DIRECT [™] | Invitrogen, 610.12 |
| iScript [™] cDNA Synthesis Kit | BioRad, 170-8890 |
| Omniscript [®] Reverse Transcription | Qiagen, 205111 |

7.1.4 Radioliganden

| | Spezifische Aktivität | | Hersteller |
|----------------------------------|-----------------------|----------|---------------------------|
| | Ci/mmol | TBq/mmol | |
| [³ H]CCPA | 48.6 | 1.80 | PerkinElmer Life Sciences |
| | 42.6 | 1.58 | |
| [³ H]DPCPX | 129 | 4.77 | Amersham Life Sciences |
| [³ H]MSX-2* | 84 | 3.11 | Amersham Biosciences |
| [³ H]PSB-603* | 73 | 2.79 | GE Healthcare |
| [³ H]PSB-11* | 53 | 1.96 | Amersham Biosciences |
| [³ H]Thymidin | 20 | 0.74 | Hartmann Analytics |
| [³⁵ S]GTP γ S | 1250 | 46.25 | PerkinElmer Life Sciences |

* Die nicht radioaktiven Vorstufen dieser Radioliganden wurden in unserem Arbeitskreis, AK Prof. Dr. C.E. Müller, synthetisiert. Die Tritiierung erfolgte dann extern.^{178,190,330}

7.1.5 Gewebe / Zellen und deren Ursprung

| | |
|---|---|
| Rattenhirne | Pel Freez [®] , Rogers, Arkansas, USA |
| primäre Lymphozyten (human) | Humane primäre native Lymphozyten; Frisch isoliert aus dem Blut („buffy coats“) gesunder Spender, Institut für Hämatologie, Blutspendedienst Universitätsklinikum Bonn |
| Jurkat T-Zellen (human) | Humane T-Leukämiezellen (ALL); Arbeitskreis Prof. Dr. K. Schilling, Anatomisches Institut Universität Bonn Arbeitskreis Prof. Dr. I. Merfort Pharmazeutisches Institut Universität Freiburg |
| CHO-hA₁-Zellen (Hamster) CHO-hA_{2A}-Zellen CHO-hA₃-Zellen | Eierstockzellen chinesischer Hamster; Arbeitskreis Prof. Dr. K.-N. Klotz Institut für Pharmakologie und Toxikologie Universität Würzburg |
| CHO-hA_{2B}-Zellen (Hamster) | Eierstockzellen chinesischer Hamster; transfiziert von Sonja Hinz, ¹⁷⁸ Arbeitskreis Prof. Dr. C.E. Müller Universität Bonn |

7.1.6 Pufferlösungen

| Puffer | Komponenten | Mw [g/mol] | Molarität | Einwaage |
|---|---|---|--|---|
| TRIS-Puffer 50 mM, pH 7.4 | TRIZMA [®] -Base → ad 1.0 l aqua dest.; mit HCl (37%) auf pH 7.4 | 121 | 50 mM | 6.05 g |
| TRIS/EDTA-Puffer (5 mM/2 mM) | TRIZMA [®] -Base EDTA → ad 500 ml aqua bidest, Lagerung bei 4°C | 121 372.2 | 5 mM 2 mM | 303 mg 372 mg |
| PBS-Puffer (free) (1 x) | NaCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KCl KH ₂ PO ₄ → ad 1.0 l aqua bidest, mit HCl (37%) auf pH 7.2 für den Gebrauch in der Zellkultur evtl. autoklavieren. | 58.5 178 74.6 136.1 | 140 mM 8 mM 2.7 mM 1.5 mM | 8.76 g 1.34 g 186.3 mg 204.2 mg |
| + 2 mM EDTA | EDTA | 372.2 | 2 mM | 744 mg |
| Krebs-HEPES- Puffer (KHP) (5 x) | NaCl KCl KH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ D-Glucose (H ₂ O-frei) HEPES (freie Säure) → + 450 ml aqua dest auffüllen, mit NaOH (1N) auf pH 7.4 → ad 500 ml aqua dest, Aliquots à 100 ml einfrieren (-20°C) | 58.5 74.6 136.1 84 180.2 238.3 | 118.6 mM _{1x} 4.7 mM _{1x} 1.2 mM _{1x} 4.2 mM _{1x} 11.7 mM _{1x} 10 mM _{1x} | 16.85 g 875 mg 400 mg 875 mg 5.25 g 5.95 g |
| Stammlösungen MgSO₄ und CaCl₂ | MgSO ₄ x 7 H ₂ O → ad 10 ml aqua bidest CaCl ₂ x 2 H ₂ O → ad 10 ml aqua bidest | 246.5 147.0 | 1 M 1 M | 2.465 g 1.47 |
| Krebs-HEPES- Puffer (KHP) (1 x) | Aufgetautes 100 ml-Aliquot KHP (5 x) + 650 µl CaCl ₂ - Stammlösung + 600 µl MgSO ₄ Stammlösung ad 500 ml aqua dest., pH-Wert 7.4 nachkontrollieren. | | | |
| Waschpuffer für Bindungsstudien mit [³H]PSB-603 | TRIS-Puffer bzw. KRH-Puffer + BSA | | 50 mM siehe unten 0.15% | 1 l 1 l 1.5 g |

| Puffer | Komponenten | Mw [g/mol] | Molarität | Einwaage |
|---|--|---------------|-----------|----------|
| Krebs-Ringer- HEPES-Puffer (KRH) (1 x) | NaCl | 58.5 | 118 mM | 6.90 g |
| | KCl | 74.6 | 4.84 mM | 361 mg |
| | KH ₂ PO ₄ | 136.1 | 1.2 mM | 163 mg |
| | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 147.0 | 2.44 mM | 359 mg |
| | MgSO ₄ | 120.4 | 2.43 mM | 292 mg |
| | HEPES | 238.3 | 10 mM | 2.38 g |
| → ad 1.0 l aqua bidest, mit 0.1 M NaOH auf pH 7.4 | | | | |
| 10 mM Tricin/5 mM DTT-Puffer, pH 7.0 | Tricin | 179.2 | 10 mM | 89.6 mg |
| | DTT | 154.2 | 5 mM | 38.6 mg |
| | → ad 50 ml aqua bidest; mit 0.1 M NaOH auf pH 7.0 Dieser Puffer wird zur 1:1000-Verdünnung des Radioligan- den [³⁵ S]GTPγS verwendet. | | | |
| Inkubationspuffer für [³⁵S]GTPγS- Bindungsstudien | TRIZMA [®] -Base | 121 | 50 mM | 6.05 g |
| | NaCl | 58.5 | 100 mM | 5.84 g |
| | EDTA | 372.2 | 1 mM | 370 mg |
| | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 203.3 | 5 mM | 1.02 g |
| | DTT | 154.2 | 1 mM | 150 mg |
| | → ad 1.0 l aqua bidest, mit HCl (37%) auf pH 7.4 Vor der Verwendung wird dem Puffer GDP in Form einer 1 mM Stammlösung in 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 (Endkon- zentration 0.01 mM GDP) und BSA 0.5% frisch zugesetzt. | | | |
| Waschpuffer für [³⁵S]GTPγS- Bindungsstudien | TRIZMA [®] -Base | 121 | 50 mM | 6.05 g |
| | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 203.3 | 5 mM | 476 mg |
| | → ad 1.0 l aqua bidest, mit HCl (37%) auf pH 7.4 | | | |
| Trypsin-EDTA- Lösung (steril) | PBS | | | 500 ml |
| | EDTA-Lösung | 0.5 M, pH 7.6 | | 0.6 ml |
| | → 20 min bei 121°C autoklavieren, 10 ml Trypsin (2.5%, steril) und 1.5 ml Phenolrot (0.5%, steril) beimischen und die Lösung bei -20°C lagern. | | | |
| Sucrose-Lösung (0.32 M) | Sucrose | 342.3 | 0.32 M | 109.5 g |
| | → ad 1.0 l aqua bidest, auf pH 7.4 einstellen | | | |

| Puffer | Komponenten | Mw [g/mol] | Molarität | Einwaage |
|--|---|------------------------|-----------|----------|
| FACS-Puffer | PBS | Herstellung siehe oben | | |
| | FCS | | 1% | |
| | EDTA | 372.2 | 2 mM | |
| | NaN ₃ | 65 | 0.02% | |
| Oregon-Green-Stammlösung | Oregon-Green | 1258.07 | 1mM | 50 µg |
| | DMSO | | | 39.7 µl |
| | Unter Lichtausschluss lösen, gut vortexen, in Aliquots à 3 µl in Eppendorf-Caps bei -20°C einfrieren. | | | |
| Pluronic®-F127 Stammlösung | Pluronic F127 | | | 200 mg |
| | DMSO | | | 800 µl |
| | Lagerung bei RT. | | | |
| Puffer A zur Membranpräparation | TRIZMA®-Base | 121 | 25 mM | 3.025 g |
| | Sucrose | 342.3 | 0.32 M | 109.5 g |
| | EDTA | 372.2 | 1 mM | 372.2 mg |
| | PMSF | 174.2 | 0.1 mM | 17.4 mg |
| | → ad 1.0 l aqua bidest, auf pH 7.4 einstellen. | | | |
| Puffer B zur Membranpräparation | TRIZMA®-Base | 121 | 50 mM | 6.05 g |
| | EDTA | 372.2 | 5 mM | 1.86 g |
| | EGTA | 380.4 | 5 mM | 1.90 g |
| | → ad 1.0 l aqua bidest, auf pH 7.4 einstellen | | | |
| PHA-Lösung (100 µg/ml) | PHA | | | 25 mg |
| | VLE-RPMI-Medium + Penic./Streptom. | | | 250 ml |
| | PHA in Medium lösen und in Aliquots à 10 ml (Falcons) bzw. 1 ml (Eppendorf-Caps) bei -20°C bis Gebrauch lagern. | | | |
| | | | | |

7.2 Zellkultur

Alle Zellen werden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Je nach Ansatz bzw. Verwendungszweck werden unterschiedliche Kulturflaschen der Größen 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² verwendet. Die verwendeten Nährmedien sind in **Tab. 7-27** aufgelistet.

Tab. 7-27: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

| Zelllinie / Zellart | Nährmedium | Zusätze |
|--|---------------------------|--|
| Jurkat T (Suspensionszellen) | RPMI 1640 | 10% FCS 2 mM Glutamin 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin |
| Primäre Lymphozyten (Suspensionszellen) | VLE-RPMI 1640 | 10% FCS 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin |
| Rekombinante hA₁-CHO-Zellen | DMEM-F12 | 10% FCS |
| Rekombinante hA_{2A}-CHO-Zellen | (Mixture 1:1) | 100 I.U./ml Penicillin |
| Rekombinante hA₃-CHO-Zellen (adhärente Zellen) | | 100 µg/ml Streptomycin 0.4% G418-Lösung (enthält 50 mg/ml Gentamicin-Sulfat) |
| Rekombinante hA_{2B}-CHO-Zellen (adhärente Zellen) | DMEM-F12 (Mixture 1:1) | 10% FCS 2 mM Glutamin 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0.4% G418-Lösung (enthält 50 mg/ml Gentamicin-Sulfat) |

7.2.1 Nährmedien für die Zellkultur

Medien der Zellkultur bestehen aus einem isotonischen, gepufferten Grundnährmedium mit anorganischen Salzen, energieliefernden Nährstoffen, Aminosäuren und Vitaminen. Bei Medien für adhärente Zelllinien ist ein hoher Anteil an Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen wichtig, da diese mit Adhäsionsproteinen auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung treten und so die Anheftung der Zellen erst ermöglichen.

Eingesetzte Medien:

- DMEM/F-12 (Mixture 1:1): Gibco 31330-095, Cambrex
- RPMI 1640: Gibco 31870-025; Cambrex BE12-167F
- VLE-RPMI 1640: BioChrom FG 1415

Zusätze:

- Fötale Kälberserum (FKS; Synonyme FCS, FBS): hitzeinakt. Sigma F 0804
FCS wird aus dem Blut von Rinderföten zwischen dem 3. und 7. Trächtigkeitsmonat gewonnen und ist ein sehr wichtiges Supplement in Zellkultursystemen, es enthält die verschiedenen wachstumsfördernden Substanzen wie Hormone, Polypeptide, Lipide und Spurenelemente.
- GlutaMaxTM-I Supplement, 200 mM (100x) Gibco 35050-038 bzw. Ultraglutamin Lonza 7MB0044
L-Glutamin ist ein essentieller Nährstoff für die Energiegewinnung und die Nucleinsäuresynthese in Zellkulturen. Allerdings zerfällt das L-Glutamin abhängig von Temperatur und pH-Wert im Medium spontan und nichtenzymatisch zu Pyrrolidon-Carbonsäure und Ammoniak, welches eine toxische Wirkung auf die Zellen hat und u.a. die Proteinproduktion beeinflusst. GlutaMax und Ultraglutamin enthalten ein stabiles Glutamin-haltiges Dipeptid (L-Alanyl-L-Glutamin), welches durch die Zellen durch enzymatische Spaltung der Peptidbindung wieder in L-Glutamin umgewandelt wird. Durch den Einsatz dieser Dipeptide wird die Bildung von toxischem Ammoniak minimiert und die Medium-Stabilität erhöht.
- Penicillin-Streptomycin Mixture, Sigma P-0781, BioWhittakerTM Cambrex DE-17-602 E, 10000 units Penicillin/ml, 10000 µg Streptomycin/ml.

- G418 / Genticin, Merck 345810

G418 ist ein aminoglykosidisches Antibiotikum ähnlich der Struktur von Gentamycin. Es blockiert die Polypeptidsynthese durch Inhibition des Elongationsschrittes sowohl in Prokaryonten als auch in eukaryotischen Zellen. G418 wird in der Zellkultur weit verbreitet eingesetzt als Selektionsmedium für genetisch veränderte Zellen, die dann ein zusätzliches Resistenzgen für G418 besitzen.

- Trypsin-EDTA-Lösung (0.05%), Gibco 25300-054

Trypsin: Sigma T-4549, Lonza 17-160

Trypsin gehört zu den sogenannten Endopeptidasen, die Eiweißmoleküle an bestimmten Stellen in der Mitte der Eiweißkette spalten. Trypsin ist spezifisch für die Spaltung von Peptidbindungen neben den Aminosäureresten Lysin und Arginin.

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) komplexiert zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} , welche zellbindende Membranproteine stabilisieren.

Trypsin wird im Zusammenhang mit EDTA in der Zellkultur zur Ablösung adhären-ter Zellen von der Zellkulturflasche verwendet.

- Trypanblau-Lösung (0.4%), Sigma T-8154

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er wird benutzt, um die Vitalität von Zellen zu prüfen. Da bei toten Zellen die Zellwände nicht mehr intakt sind, kann der Farbstoff in das Innere der Zelle eindringen und Proteine blau anfärben, die Zellwand der lebenden Zellen ist für den Farbstoff weitgehend undurchlässig. Durch das Mikroskop betrachtet erscheinen so tote Zellen im Gegensatz zu lebenden Zellen blau.

7.2.2 Isolierung humaner Lymphozyten aus „buffy coats“

Die Isolation der Lymphozyten erfolgte aus sogenannten „buffy coats“, welche bei der Aufbereitung von peripheren Vollblutspenden gesunder Spender anfallen. Es handelt sich hierbei um Blut, dem gezielt große Teile des Plasmas und der Erythrozyten entnommen wurden und in welchem deshalb Leukozyten konzentriert vorhanden sind. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation auf Pancoll human (enthaltene aktive Komponente: Ficoll) werden zunächst mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Anschließend erfolgt die Abtrennung der Monozyten durch Adhäsion an Plastik. Das folgende Proto-

koll wurde erstmals 1968 von Böyum beschrieben³³¹ und ist hier mit leichten Modifikationen aus den *Current Protocols in Immunology* entnommen.

Zuerst werden die „buffy coats“ (in einem Beutel befinden sich ca. 50 ml) auf drei 50 ml-Falcon-Tubes verteilt (ca. 15 ml pro Falcon) und mit PBS/2 mM EDTA-Puffer (RT) auf jeweils 45 ml aufgefüllt. Dabei verhindert EDTA eine Gerinnung des Blutes, da es u.a. Ca^{2+} -Ionen komplexiert, welche von Gerinnungsfaktoren benötigt werden. In vier weitere 50 ml-Falcons werden nun 15-20 ml Pancoll (human, Dichte 1.077 g/l, RT) vorgelegt, was langsam und sehr vorsichtig mit der Blut-Puffermischung überschichtet wird. Die Falcons werden für 30 min bei 800 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert, um eine Verwirbelung des Gradienten zu verhindern. Ficoll ist ein weit verzweigtes Sucrose-Polymer mit einem Molekulargewicht von ca. 400 kDa, kommen Erythrozyten in Kontakt mit Ficoll, aggregieren diese (siehe **Abb. 7-65**, linkes Bild). Durch die Zentrifugation sedimentieren Komponenten mit einer höheren Dichte als Ficoll, also die verklumpten Erythrozyten und Granulozyten, auf den Boden des Röhrchens, die mononukleären Zellen bilden eine sichtbare weisse Schicht auf der Ficoll-Phase, das Plasma und die Blutplättchen bilden die oberste Schicht (siehe **Abb. 7-65**).

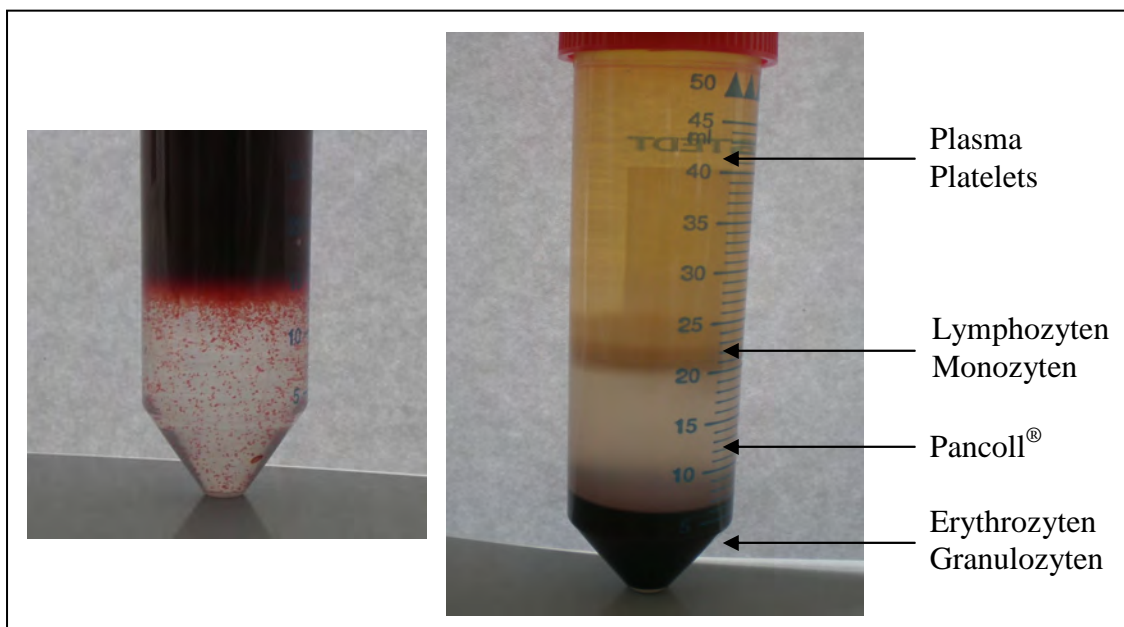


Abb. 7-65: Ficoll-Gradient zur Isolierung von PBL aus „buffy coats“, vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) der Zentrifugation

Die PBMC-Schicht wird vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Falcon überführt. Um enthaltene restliche Thrombozyten und Erythrozyten

zu entfernen, werden die Zellen 3-4 Mal in 50 ml PBS/2 mM EDTA-Puffer gewaschen. Die Zentrifugation der einzelnen Waschschr tte erfolgt bei RT für 5 min und 600 x g beim ersten, 400 x g beim zweiten und 200 x g bei den weiteren Waschschr tten. Ist das Pellet nun noch r tlich gefärbt, folgt ein zweiter Gradient. Dabei wird das Pellet eines Spenders vereint und auf 20-25 ml mit PBS/2 mM EDTA aufgefüllt. In ein weiteres 50 ml-Falcon wird 10-20 ml Pancoll vorgelegt und die Pellet-Puffer-Mischung wiederum langsam und vorsichtig aufgeschichtet, es folgt die Zentrifugation bei 800 x g für 30 min bei RT ohne Bremse. Die weiße Interphase kann nun wieder mit einer Pasteurpipette abgenommen werden und es folgen weitere drei Waschr tte, wieder in jeweils 50 ml PBS/2 mM EDTA-Puffer für 5 min bei RT, 1. bei 600 x g, 2. bei 400 x g und 3. bei 200 x g, dies dient nun hauptsächlich zum Entfernen von restlichem Pancoll. Danach sollte der Überstand klar und das Zellpellet weiss erscheinen. Die so erhaltenen PBMC werden in VLE-RPMI 1640-Medium mit FCS und Penicillin/Streptomycin resuspendiert, gezählt und auf eine Dichte von 6×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 20-25 ml der Suspension werden in große Zellkulturplatten („Dishes“)  berf hrt und für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert, dabei adhärieren die enthaltenen Monozyten auf dem Plastik. Anschließend werden die nicht adhärenten Zellen – die peripheren Blutlymphozyten (PBL) – abgenommen, in eine Zellkulturflache überführt und bis zur Verwendung, maximal jedoch 5 Tage bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension enthält über 95% lebende Zellen, ermittelt über Trypanblau-Färbung.

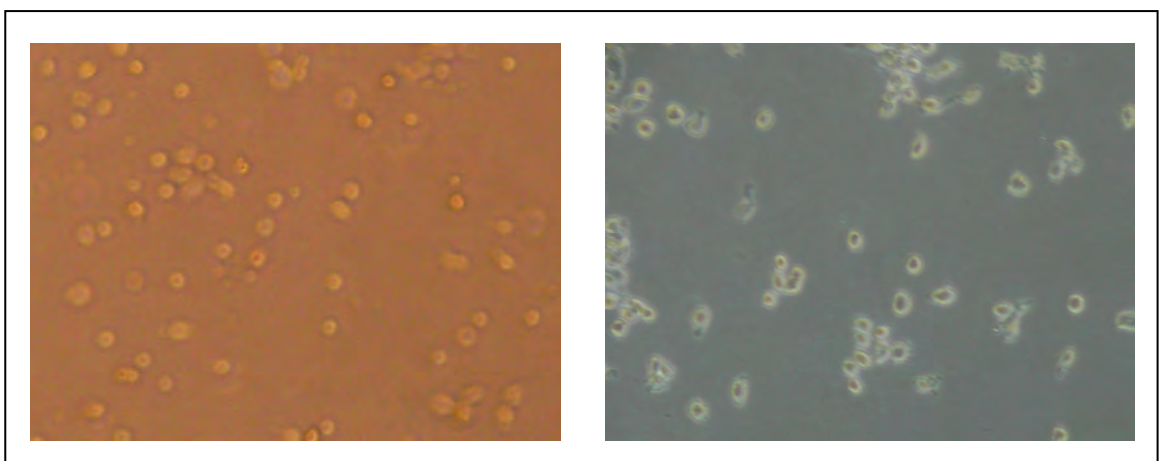


Abb. 7-66: PBL nach der Isolierung, Ansicht durch das Mikroskop, fotografiert mit einer Digitalkamera

7.2.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellbackups für die weitere Kultivierung wird möglichst schnell durchgeführt: die in Kryovials aufgetaute Zellsuspension (meist ca. 1 ml) wird steril in eine kleine, vorher mit dem entsprechenden Medium befüllte und im Brutschrank vorinkubierte Zellkulturflasche überführt. Die Zellen werden nun einige Stunden im Brutschrank (37°C - 5% CO₂ - 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert und anschließend das Medium gewechselt, um das noch vorhandene DMSO und tote Zellen zu entfernen. Nun können die Zellen weiter - wie im nächsten Abschnitt beschrieben - kultiviert werden.

7.2.4 Kultur und Splitten von Zellen

Adhärent wachsende Zelllinien werden bei 80-90%iger Konfluenz gesplittet. Dabei wird zuerst das alte Medium aus der Flasche vorsichtig abdekantiert und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Zur Ablösung der Zellen von dem Flaschenboden werden 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche gegeben und diese 2-3 Minuten im Brutschrank inkubiert, die Zellen müssten sich nun durch leichtes Schwenken und Klopfen gegen den Flaschenboden gut vom Boden lösen. Sie werden dann in je nach Splittverhältnis benötigtem Volumen an Medium aufgenommen und auf neue, bereits mit vorgewärmtem Medium befüllte Flaschen verteilt. Falls das Medium verbraucht ist (erkennbar an einem Farbumschlag), die Zellen jedoch noch nicht konfluent genug, wird einfach das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Mediummenge in 75 cm²-Flaschen beträgt 15 ml, in 175 cm²-Flaschen 25-30 ml. Chinesische-Hamster-Ovarial(CHO)-Zellen sind adhärente, fibroblastoide Zellen, für die ein optimales Splittverhältnis von 1:3 bis 1:10 konfluenter Kulturen beschrieben wird. In eine 75 cm²-Zellkulturflasche sollten dabei 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen ausgesät werden, die Zellen sind dann nach 3-4 Tagen konfluent gewachsen, die Verdopplungszeit beträgt ca. 24 h (http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php).

Nicht adhärent wachsende Zelllinien werden durch ein Verdünnen der Zellsuspension mit frischem, vorgewärmtem Medium gesplittet. Für einen Mediumwechsel wird die Zellsuspension in 50 ml-Falcons überführt, bei 200 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert, das alte Medium im Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufge-

nommen und auf Zellkulturflaschen verteilt. Bei Jurkat T-Zellen handelt es sich um runde, vereinzelt oder in Klumpen wachsende Suspensionszellen, für die ein optimales Splittverhältnis von 1:2 bis 1:3 alle zwei bis drei Tage und eine optimale Kultivierungsdichte von $0.5\text{--}1.5 \times 10^6$ Zellen/ml beschrieben wird (http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php). Sie besitzen eine Verdopplungszeit von 25-35 h. Da es sich bei den für diese Arbeit verwendeten nativen humanen Lymphozyten um primäre Zellen handelt, können diese nicht über längere Zeit kultiviert werden, nach der Isolierung werden sie innerhalb der folgenden 5 Tagen für die Versuche eingesetzt.

7.2.5 Erstellen von Backups / Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wird die Zellsuspension (bei adhären wachsenden Zellen nach dem oben beschriebenen Ablösen mit Trypsin) in Falcons überführt und bei $200 \times g$ und 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Zellpellet bei Jurkat T-Zellen in 70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO und einer Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/Kryovial; bei CHO-Zellen in 70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO und einer Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/Kryovial resuspendiert. Das hierbei zugesetzte DMSO soll die Bildung von Kristallen während des Einfriervorganges minimieren/verhindern, da diese die Zellwände verletzen und so die Zelle schädigen können. Die so erhaltene Zellsuspension wird zu 1 ml-Aliquots in Kryovials aliquotiert und sofort bei -20°C eingefroren. Nach 8-10 h werden die Aliquots in den -80°C -Gefrierschrank überführt und zur längeren Aufbewahrung nach 2-5 Tagen in den Stickstofftank umgelagert.

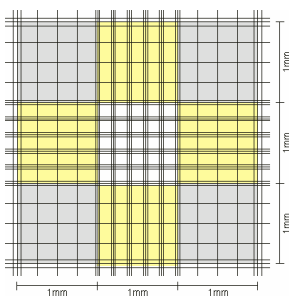
7.2.6 Stimulierung der Proliferation von Lymphozyten

Die frisch aus „buffy coats“ isolierten primären Lymphozyten bzw. Jurkat T-Zellen, die stimuliert werden sollen, werden in (eine) saubere 175 cm^2 -Zellkulturflasche(n) überführt (in den Zellkonzentrationen, die auch für die „normale“ Kultur der jeweiligen Zellen vorgegeben sind) und mit aufgetauter Phytohaemagglutinin (PHA)-Lösung ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$, siehe Kapitel „Pufferlösungen“) versetzt, sodass eine PHA-

Endkonzentration von 10 µg/ml in der Zellkulturflasche herrscht. Die Zellen werden dann entweder direkt in den Versuch eingesetzt (Proliferationsassay) oder über Nacht, höchstens jedoch 2-3 Tage inkubiert. Dabei muss das Medium beobachtet und ggf. gewechselt werden.

7.2.7 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wird mit einer Neubauer Zählkammer (Hämazytometer) durchgeführt. Zuerst werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt, um tote von vitalen Zellen unterscheiden zu können: 20 µl der evtl. verdünnten Zellsuspension werden mit 20 µl der 0.4%igen Trypanblau-Lösung in einem Eppendorftube vorsichtig vermischt und 5-15 min bei RT inkubiert. Die beiden Stege der Zählkammer werden mit ein wenig Wasser etwas angefeuchtet und darauf das Deckglas parallel zur Oberfläche auf die Kammer gedrückt. Auf den Mittelsteg zwischen Deckglas und Kammer werden nun 10-15 µl der Zell-Trypanblau-Lösung pipettiert, bis das Volumen unter dem Deckglas durch Kapillarwirkung gerade gefüllt ist. Danach erfolgt unter dem Mikroskop das Auszählen der Kammer. Diese besteht aus $3 \times 3 = 9$ Großquadraten (Kantenlängen jew. 1 mm \rightarrow Fläche 1 mm², Kammerhöhe 0.1 mm \rightarrow Volumen pro Großquadrat = 0.1 mm³ = 10⁻⁴ cm³ = 10⁻⁴ ml), von denen man drei bis vier Eckquadrate - bestehend aus jeweils $4 \times 4 = 16$ Kleinquadraten - auszählt. Optimalerweise sollten pro Großquadrat nicht mehr als 40 Zellen vorhanden sein, gezählt werden nur die hell durchscheinenden vitalen Zellen, tote blaue Zellen werden ignoriert. Die erhaltene Zellzahl wird durch die Zahl der ausgezählten Großquadrate geteilt, das Ergebnis entspricht der mittleren Zellzahl pro Großquadrat, also pro 10⁻⁴ ml. Dieser Wert wird mit 10⁴ (und dem evtl. Verdünnungsfaktor) multipliziert und man erhält die Zellzahl lebender Zellen pro ml Medium.



$$\text{Zellzahl/ml Probensuspension} = \text{Zellzahl/Großquadrat} \times 10^4$$

(x evtl. Verdünnungsfaktor)

Abb. 7-67: Neubauer Hämazytometer (www.upload.wikimedia.org, Verfügbarkeitsdatum 15.08.2008)

7.3 Membranpräparationen

Für die vorliegende Arbeit wurden Membranpräparationen von Rattenhirnen der Firma Pel Freez[®] (Rogers, Arkansas, USA), primärer humaner Lymphozytenzellen sowie der Zelllinien Jurkat T und CHO-hA₁/hA_{2B}/hA₃ hergestellt.

7.3.1 Membranpräparation von Rattenhirn-Gewebe

Die bei -80°C gelagerten Rattenhirne werden langsam auf Eis aufgetaut und mit einigen Tropfen Sucrose-Lösung beträufelt. Zur Präparation werden sie dann auf eine Glasfläche gelegt und mit einer Pinzette am Kleinhirn fixiert, mit einem Skalpell wird sehr vorsichtig die Hirnrinde (Cortex) - die äußeren 2-3 mm des Rattenhirns - abgeschabt, bis die darunter liegende, deutlich heller scheinende Hirnregion zu sehen ist. Das gesammelte Gewebe wird in etwa 100 ml eiskühlte 0.32 M Sucrose-Lösung (isotonischer Puffer) gegeben. Das Striatum erhält man, indem man - nach Entfernen des Cortex - im vorderen Drittel der beiden Großhirnhälften das Gewebe von oben weiter soweit abnimmt, bis das ovale Striatum-Gewebe, welches eine dunklere, gestreifte Struktur besitzt, zu erkennen ist. Dieses wird herauspräpariert und in etwa 100 ml eiskaltem Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4 gesammelt.

7.3.1.1 Membranpräparation von Rattenhirn-Cortex (P2)³³²

Zur Bestimmung des Nassgewichtes wird das gesammelte Gewebe gewogen. Die Cortexmembranen werden dann mit Hilfe eines Ultraturrax (Stufe 3, 60 s auf Eis) aufgeschlossen, die erhaltene Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1,000 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt dient zur Abtrennung von Zellkernen, groben Zelltrümmern und eventuell noch vorhandenen Erythrozyten, die sich im Pellet ansammeln. Deshalb wird das sogenannte P1-Pellet verworfen und der Überstand S1 auf saubere Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 48,000 x g und 4°C für 45-60 min zentrifugiert. Der Überstand S2 wird durch Abdekantieren vom P2-Pellet getrennt und verworfen. Das P2-Pellet wird in eiskaltem aqua bidest aufgenommen, wiederum mit dem

Ultraturrax (Stufe 3, 10 s auf Eis) zerkleinert und nochmals 60 min bei 48,000 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wird dann in 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 aufgenommen, es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 48,000 x g, 4°C für 60 min. Nach diesem letzten Waschschrift wird das erhaltene Pellet in wenig (2ml pro g Nassgewicht) Tris-Puffer 50 mM, pH 7.4 aufgenommen und mit dem Homogenisator (3-4 mal, Stufe 7-10, auf Eis) homogenisiert. Die so erhaltene Proteinsuspension wird in Kryovials bzw. Eppendorfcaps à 1 ml aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

7.3.1.2 Membranpräparation von Rattenhirn-Striatum (P1)³³³

Die gesammelten Gewebestücke werden mit dem Ultraturrax (Stufe 3, 60s) zerkleinert. Die Suspension wird auf Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 37,000 x g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und verworfen. Das Pellet wird in eiskaltem Tris-Puffer 50 mM, pH 7.4 aufgenommen, zerkleinert (Ultraturrax Stufe 3, 10 s) und erneut 15 min bei 37,000 x g, 4°C zentrifugiert. Zum Schluss wird das erhaltene Pellet - nach Bestimmung des Nassgewichtes - in wenig (1.5 ml pro g Nassgewicht) Tris-Puffer 50 mM, pH 7.4 resuspendiert, homogenisiert und in Kryovials aliquotiert. Die Aliquots werden bis zur Benutzung bei -80°C gelagert.

7.3.2 Membranpräparationen von Zellen

7.3.2.1 Membranpräparation von Jurkat T-Zellen (P2)

Die Zellsuspension in Medium - die entweder in Zellkulturflaschen oder für größere Mengen in Gewebekulturschalen gezüchtet wurde - wird zuerst auf 50ml-Falcontubes verteilt und bei 200 x g, 4°C für 5 min zentrifugiert, das Medium im Überstand wird verworfen. Das erhaltene Pellet wird sofort bei -80°C schockgefroren, um evtl. ablaufende zelluläre Vorgänge wie Rezeptorinternalisierung zu verhindern. Das kurz angetaute Pellet wird in eiskaltem Puffer A (siehe Kapitel Pufferlösungen) resuspendiert, mit dem Ultraturrax (Stufe 3, 30 s, auf Eis) zerkleinert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wird dann in einem ersten Zentrifugationsschritt für 10 min bei

1,000 x g und 4°C zentrifugiert (Abtrennung des P1-Pellets – Zellkerne und Zelltrümmer). Der Überstand S1 wird sehr vorsichtig – ohne das Pellet aufzuwirbeln – abgenommen und das Pellet verworfen. Der Überstand S1 wird nun in saubere Zentrifugenröhrchen überführt und für 1 h bei 48,000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand S2 wird abdekantiert und verworfen und das P2-Pellet in eiskaltem aqua bidest aufgenommen. Die Suspension wird erneut mit dem Ultraturrax zerkleinert (Stufe 3, 10 s auf Eis) und zentrifugiert (48,000 x g, 4°C, 30-60 min). Das so erhaltene Pellet wird dann in wenig 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 aufgenommen und mit dem Homogenisator (3-4 Mal, Stufe 7-10, auf Eis) homogenisiert. Die so gewonnene Proteinsuspension wird in Kryovials bzw. Eppendorfcaps à 1 ml aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

7.3.2.2 Membranpräparation von primären humanen Lymphozyten (P1 und P2)

Die Zellsuspension in Medium - nach der Isolierung mindestens über Nacht, höchstens jedoch 3-5 Tage in Zellkulturflaschen ruhen gelassen - wird zuerst auf 50ml-Falcontubes verteilt und bei 500 x g, 4°C für 5 min zentrifugiert, das Medium im Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in eiskaltem Puffer B (Tris/EDTA/EGTA), siehe Kapitel Pufferlösungen) resuspendiert, mit dem Ultraturrax (Stufe 3, 30 s, auf Eis) zerkleinert und in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 48,000 x g, 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet erneut in Puffer B resuspendiert und bei 48,000 x g, 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wird nun ein letztes Mal in Puffer B aufgenommen und zerkleinert (Ultraturrax Stufe 3, 30 s auf Eis), um dann in einem Falcontube bei -80°C eingelagert zu werden. Da bei einem Isolierungsvorgang primärer Lymphozyten die Zellausbeute im Vergleich zu permanenten Zelllinien sehr gering ist und sich eine P2-Membranpräparation aufgrund des hohen Verlustes nicht für jede P1-Präparation lohnt, werden mehrere P1-Membranpräparationen aus unterschiedlichen Isolierungen gesammelt, vereint und dann eine gemeinsame P2-Membranpräparation durchgeführt. Dafür werden die Falcons mit den P1-Präparationen auf Eis aufgetaut, zerkleinert (Ultraturrax, Stufe 3, 30 s auf Eis) und in Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgt eine erste Zentrifugation bei 37,000 x g, 4°C für 10-15 min. Das Pellet wird in Puffer A resuspendiert und für 10 min bei 1,000 x g und 4°C zentrifugiert (Abtrennung des P1-Pellets – Zellkerne und Zelltrümmer). Der Überstand S1 wird sehr

vorsichtig – ohne das Pellet aufzuwirbeln – abgenommen und das Pellet verworfen. Der Überstand S1 wird nun in saubere Zentrifugenröhrchen überführt und für 1 h bei 48,000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand S2 wird abdekantiert und verworfen und das P2-Pellet in eiskaltem aqua bidest aufgenommen. Die Suspension wird erneut mit dem Ultraturrax zerkleinert (Stufe 3, 10 s auf Eis) und zentrifugiert (48,000 x g, 4°C, 30-60 min). Das so erhaltene Pellet wird dann in wenig 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 aufgenommen und mit dem Homogenisator (3-4 Mal, Stufe 7-10, auf Eis) homogenisiert. Die so erhaltene Proteinsuspension wird in Kryovials bzw. Eppendorfcaps à 1 ml aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

7.3.2.3 Membranpräparation von CHO-hA₁/hA_{2B}/hA₃-Zellen

Für die Membranpräparation der adhärent wachsenden Zelllinien CHO-hA₁/hA_{2B}/hA₃ werden die Zellen auf Gewebekulturschalen in großer Zahl hochgezüchtet (meist 150-180 Dishes). Sind die Zellen dann 70-80% konfluent gewachsen, wird das Medium abgeschüttet, jede Schale mit ca. 5 ml PBS gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgefroren. Man lässt die Dishes kurz antauen, gibt in jede Schale 1-2 ml des Tris (5 mM)/EDTA (2 mM)-Puffer hinzu und schabt die Zellen mit einem Gummischauber vom Schalenboden ab – die so erhaltene Zellsuspension wird dann in einem Becherglas auf Eis vereinigt und gesammelt. Alle Dishes werden mit wenig Puffer nachgespült. Nun werden die Zellen mit dem Ultraturrax (Stufe 3, ca. 60 s auf Eis) zerkleinert und mit dem Homogenisator (Stufe 10, 10 x) aufgeschlossen. Die Zellsuspension wird dann auf acht Zentrifugenröhrchen verteilt und 10 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand S1 wird sehr vorsichtig – ohne das Pellet aufzuwirbeln – abgenommen und das Pellet verworfen. Der Überstand S1 wird nun in saubere Zentrifugenröhrchen überführt und für 45 min bei 37,000 x g und 4°C zentrifugiert, der hierbei anfallende Überstand wird verworfen und das Pellet gewogen (Nassgewicht). Danach wird es in ca. 25-30 ml TRIS-Puffer 50 mM, pH 7.4 resuspendiert und erneut bei 37,000 x g und 4°C für 45 min zentrifugiert. Das Pellet wird dann in 0.1 ml TRIS-Puffer 50 mM, pH 7.4/Dish resuspendiert und aus den Zentrifugenröhrchen vereinigt, mit dem Ultraturrax zerkleinert und mit dem Homogenisator homogenisiert. Die so erhaltene Proteinsuspension wird in Kryovials bzw. Eppendorfcaps à 1 ml aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

7.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Mit Hilfe des kolorimetrischen Verfahrens der Proteinbestimmung nach Lowry^{334,335} lassen sich Konzentrationen löslicher und unlöslicher Proteine bestimmen. Die Methode beruht auf der Grundlage, dass Proteine bzw. deren Peptidbindungen in einem ersten Schritt mit Cu^{2+} -Ionen aus einem Kupfertartrat-Reagenz in alkalischer Lösung zu einem blauen Komplex reagieren (sog. Biuret-Reaktion) und in einem zweiten Schritt dann Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird. Diese Cu^+ -Ionen wiederum reduzieren im gelben Folin-Ciocalteu-Reagenz enthaltene Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren zu Molybdänblau (Molybdänblaureaktion). Durch diese Reduktionen ändert das Folin-Reagenz seine Farbe von gelb nach blau, die entstandene Blaufärbung ist proportional zum Proteingehalt und kann deshalb zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen genutzt werden. Zuerst wird für eine Verdünnungsreihe einer Probe bekannter Proteinkonzentration die Absorption bestimmt, diese Werte werden nun als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt, der sogenannten Kalibriergeraden. Aus der Gleichung dieser Geraden kann anschließend für eine beliebige Proteinprobe mit Hilfe der gemessenen Absorption die zu bestimmende Proteinkonzentration ermittelt werden. Zu beachten ist bei dieser Methode, dass sie durch Substanzen wie Tris, Ammoniumsulfat, EDTA, Saccharose, Citrat, Triton X-100 und Phenole gestört werden kann. Sind solche Substanzen in der zu bestimmenden Probe vorhanden, müssen die Proteine vorher mit Trichloressigsäure ausgefällt und in einem wässrigen Lösungsmittel resolubiliert werden. Praktisch wird bei der Proteinbestimmung wie folgt vorgegangen:

Folgende Reagenzien müssen vorhanden sein bzw. frisch hergestellt werden:

| | | | | | |
|----------|--|-------|-----------|---|--|
| A | Na ₂ CO ₃ | 2% | 10 g | wichtig: CuSO ₄ und Na-Tartrat getrennt lösen und erst dann vereinen | |
| | NaOH | 0.1 N | ad 500 ml | | |
| B | CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0.5% | 0.25 g | | |
| | Na-Tartrat | 1% | 0.5 g | | |
| | Aqua bidest | | ad 50 ml | | |
| C | Frisch vereint: 50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B (z.B. 25 ml A + 0.5 ml B) | | | | |
| D | <u>Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent working solution:</u> | | | | |
| | Folin-Reagenz | | 18 ml | | |
| | Aqua bidest | | ad 90 ml | | |

Zuerst wird eine ca. 1 mg/ml-Stammlösung von BSA in H₂O hergestellt. Zur Bestimmung der genauen Konzentration wird die Lösung in einer Quarzküvette bei 280 nm vermessen, 1 mg/ml entspricht dabei einem OD-Wert von 0.66, per Dreisatz kann nun die tatsächliche Konzentration der BSA-Lösung bestimmt werden. Aus dieser Lösung wird dann eine Verdünnungsreihe mit je 200 µl Endvolumen in Tris-Puffer hergestellt, die die Soll-Konzentrationen 50 (10 µl BSA-Stock + 190 µl Tris), 100 (20 µl + 180 µl), 200 (40 µl + 160 µl), 300 (60 µl + 140 µl), 400 (80 µl + 120 µl) und 500 (100 µl + 100 µl) µg Protein(BSA)/ml umfasst. Die genauen Konzentrationen werden mit Hilfe der tatsächlichen Konzentration der BSA-Stammlösung berechnet und notiert. Auch die zu bestimmende Probe wird in Tris ad 200 µl verdünnt, dabei muss darauf geachtet werden, dass die zu erwartenden Konzentrationen im Bereich des Auswertefensters der BSA-Kurve liegen (z.B. 1:10-Verdünnung 20 µl Probe + 180 µl Tris, 1:20-Verdünnung 10 µl + 190 µl und 1:50-Verdünnung 4 µl + 196 µl). Nun wird zu jeder Proteinprobe 1 ml frisch hergestelltes Reagenz **C** zupipettiert, gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Unter sofortigem Vortexen werden dann 100 µl von Reagenz **D** (Folin & Ciocalteu's Phenol reagent working solution) in jede Probe pipettiert. Da das Folin Reagenz nur in saurer Lösung stabil ist, die Reaktion jedoch in stark alkalischem Milieu stattfindet, ist das sofortige Vortexen nach Zugabe des Folin-Reagenz zur alkalischen Kupfer-Protein-Lösung essentiell, damit die Reduktion vor der Zersetzung des Reagenz stattfinden kann. Die Mischung wird nun weitere 30 min bei RT inkubiert um dann – überführt in Plastikeinmalküvetten – im Photometer bei einer Wellenlänge von 500 nm (bei einem Proteingehalt > 25 µg/ml) bzw. 750 nm (Proteingehalt < 25 µg/ml) die Absorptionen zu vermessen.

7.5 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

7.5.1 Kompetitionsexperimente – Grundlagen

Mittels radioaktiver Markierung eines Liganden kann dessen Affinität zu einem Rezeptor direkt bestimmt werden. Da es methodisch wie finanziell viel zu aufwändig und auch technisch bzw. chemisch teilweise überhaupt nicht möglich ist, alle zu bestimmenden Liganden radioaktiv zu markieren, bedient man sich einer indirekten Methode: man misst die Fähigkeit eines (nicht markierten) Liganden mit einem Radioliganden bekannter Affinität um eine Bindungsstelle zu konkurrieren und somit die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor zu inhibieren. In einem Kompetitionsexperiment werden verschiedene Konzentrationen des Kaltliganden eingesetzt, welche mit einer konstanten Radioligandkonzentration um die Bindungsstelle konkurrieren. Dabei sollte sichergestellt sein, dass durch den Kaltliganden ein Konzentrationsbereich von drei bis vier Zehnerpotenzen mit einer gleichmäßigen Streuung um den erwarteten K_i -Wert abgedeckt sein sollte. Ist dieser schwer abschätzbar, wird zuerst ein sogenanntes „Screening“ durchgeführt, bei dem ersteinmal ein bis zwei Konzentrationen getestet werden, um den Affinitätsbereich besser einordnen zu können.

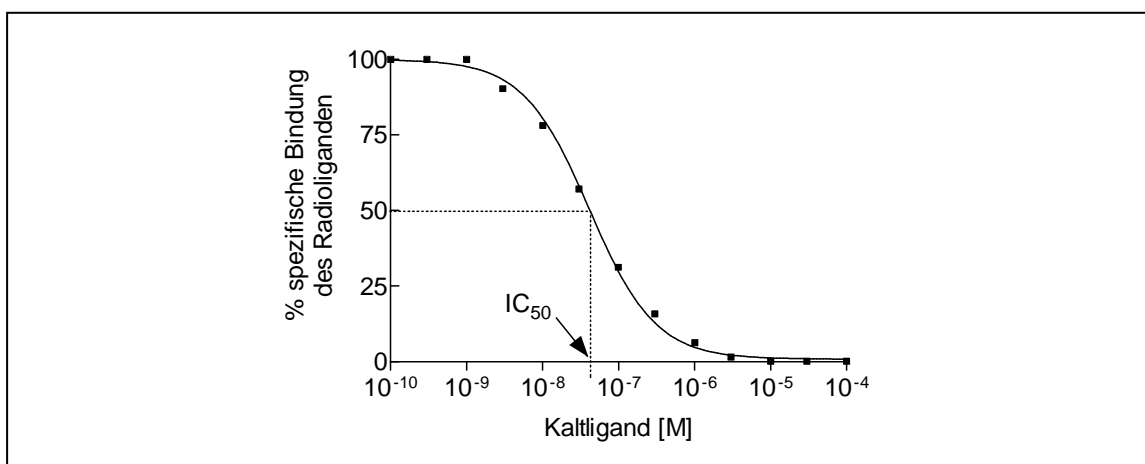


Abb. 7-68: Beispielkurve eines Radioligand-Bindungsstudien-Kompetitionsexperiments

Die Experimente werden mit dem Programm Graphpad PRISM[®] mittels nichtlinearer Regression ausgewertet, in der logarithmischen Darstellung ergibt sich ein sigmoidaler

Kurvenverlauf, sobald man die spezifische Bindung des Radioliganden (in %) gegen die Konzentration des Kaltliganden aufträgt (siehe **Abb. 7-68**). Die spezifische Bindung des Radioliganden – die sich experimentell nicht direkt bestimmen lässt – wird ermittelt, indem man die gemessenen Werte der unspezifischen Bindung von den Werten für die Gesamtbindung subtrahiert. Dabei nimmt die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor mit zunehmender Konzentration des Kaltliganden ab. Aus diesem Experiment lässt sich der Bindungsparameter IC_{50} entnehmen, der die Konzentration des Kaltliganden angibt, die eine 50%ige Hemmung der spezifischen Bindung des Radioliganden an den Rezeptor bewirkt. Unter Einbeziehung der eingesetzten Radioligandkonzentration ($[RL]$) und der Affinität des Radioliganden zum Rezeptor (K_D) kann nun mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung³²⁵ der K_i -Wert für den Kaltliganden berechnet werden:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \begin{array}{l} [L] = \text{Konzentration des Radioliganden} \\ K_D = \text{Dissoziationskonstante des Radioliganden} \end{array}$$

Jedes Experiment wird mindestens dreimal unabhängig durchgeführt und es wird der daraus resultierende K_i -Mittelwert der Einzel- K_i -Werte \pm SEM angegeben.

7.5.2 **Kompetitionsexperimente – Durchführung**

Zuerst werden die Verdünnungen der Testsubstanzen bzw. der Substanzen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung hergestellt. Da sich nicht alle zu testenden Substanzen in wässrigem Milieu lösen, wird meist das organische Lösungsmittel DMSO verwendet, die Stammlösungen der eingesetzten Substanzen sind dabei in der Regel zu 10 mM in DMSO gelöst, bei schwerlöslichen Substanzen werden (zusätzlich) 1 mM Stammlösungen angesetzt. Bei der Herstellung der Verdünnungsreihen muss auf jeden Fall darauf geachtet werden, dass eine DMSO-Endkonzentration von 2.5% für Assays an Membranpräparationen und 1.0% für Assays an intakten Zellen nicht überschritten wird – es ist bekannt, dass DMSO in hohen Konzentrationen schädlich auf Proteine wirkt. Auch sollte die DMSO-Konzentration in jedem Well/Vial konstant sein. Aus diesen Gründen muss unter Umständen, je nach eingesetztem Volumen an Substanz und

gegebenem Verdünnungsfaktor, das zur Verbesserung der Löslichkeit eingesetzte DMSO mit Assaypuffer verdünnt werden, bevor die Verdünnung hergestellt werden kann. Die so erhaltenen Substanzverdünnungen werden dann in PE-Vials bzw. die Wells der 96-Well-Platte vorgelegt, es wird dabei in Dupletts bzw. Tripletts gearbeitet. Anschließend werden die Radioligandlösung und die Proteinsuspension hergestellt. Dabei werden die jeweils benötigten Volumen an Puffer/Medium vorgelegt und der Radioligand bzw. die Membranpräparation hinzupipettiert.

$$V_{\text{Puffer/Medium}} [\mu\text{l}] = (V_{\text{fertige RL- bzw. Proteinsuspension im Assay}} [\mu\text{l}] \times n_{\text{Vials}}) - V_{\text{RL}} [\mu\text{l}]$$

$$V_{\text{RL}} [\mu\text{l}] = \frac{n_{\text{Vials}} \times \text{RL-Konz} [\text{nM}] \times V_{\text{ges}} [\text{ml}] \times \text{spez. Aktivität RL} [\text{Ci/mmol}]}{1000 \times c_{\text{RL}} [\text{Ci/l}]}$$

$$V_{\text{Membranpräp}} [\mu\text{l}] = \frac{n_{\text{Vials}} \times c_{\text{Protein im Assay}} [\mu\text{g}] \times 1000}{c_{\text{Membranpräp}} [\mu\text{g/ml}]}$$

Um evtl. in der Membranpräparation vorhandenes, endogenes Adenosin abzubauen, wird die Proteinsuspension mit ADA (0.2 I.U./mg Protein) versetzt und 10-15 min inkubiert; während dieser kurzen Inkubationszeit wird die Radioligandlösung in die Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe der Proteinsuspension gestartet und gevortext. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Versuch gestoppt, indem er mit einem Zellharvester über angefeuchtete Glasfaserfilter filtriert wird, es wird 3 x mit eisgekühltem Waschpuffer nachgespült. Dabei wird das Protein mit der daran gebundenen Radioaktivität auf dem Filter zurückgehalten und diese somit von der freien Radioaktivität getrennt. Die Filter werden dann – für das 24er- und 48er-Harvester-Format – ausgestanzt, in Szintillationsvials überführt und mit 2.5 ml Szintillationscocktail (UltimaGold[®] bzw. ReadySafe[™]) versetzt; für den 96er Harvester werden die Filterplatten von unten abgeklebt, mit 50 μl Szintillationscocktail (MicroScint-20) versetzt und mit der Siegelfolie verschlossen. Nach einer Präinkubation von 9 h wird die Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt.

7.5.3 Kompetitionsexperimente an Membranpräparationen

7.5.3.1 Kompetitionsexperimente an Ratten Adenosin-A₁-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]CCPA an Rattencortex-Membranpräparationen

Pipettierschema:

| | |
|--------|---|
| 50 µl | Tris90%/DMSO10% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM CADO in Tris90%/DMSO10% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in Tris90%/DMSO10% |
| 50 µl | [³ H]CCPA (Endkonzentration 1 nM, K _D =0.2 nM ³³⁶) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | Proteinsuspension (50 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 200 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 90 min bei Raumtemperatur

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter am 96er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4

7.5.3.2 Kompetitionsexperimente an humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]CCPA an Jurkat T- und primäre Lymphozyten-Membranpräparationen

Pipettierschema:

| | |
|---------|---|
| 25 µl | Tris50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM CADO in Tris50%/DMSO50% (unspezifische Bindung) |
| 375 µl | 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | [³ H]CCPA (Endkonzentration 1 nM) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 500 µl | Proteinsuspension (50-100 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 1000 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 90 min bei Raumtemperatur

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter am 48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4

7.5.3.3 Konkurrenzexperimente an Ratten Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 an Rattenstriatum-Membranpräparationen im 96-Well-Format

Pipettierschema:

| | |
|--------|---|
| 50 µl | Tris90%/DMSO10% (Gesamtbindung) bzw. 50 µM NECA in Tris90%/DMSO10% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in Tris90%/DMSO10% |
| 50 µl | [³ H]MSX-2 (Endkonzentration 1 nM, K _D =8 nM ³³⁰) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | Proteinsuspension (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 200 µl | Endvolumen |

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 an Rattenstriatum-Membranpräparationen im 48-Vial-Format

Pipettierschema:

| | |
|---------|---|
| 25 µl | DMSO100% (Gesamtbindung) bzw. 50 µM NECA in DMSO100% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 775 µl | 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | [³ H]MSX-2 (Endkonzentration 1 nM, K _D =8 nM ³³⁰) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | Proteinsuspension (70 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 1000 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 30 min bei Raumtemperatur

Im 48-Vial-Format: Filtration über GF/B-Glasfaserfilter – vorinkubiert für 30 min in

einer 0.3%igen PEI-Lösung zur Verminderung der unspezifischen Bindung

Im 96-Well-Format: Filtration über GF/B-Glasfaserfilter

Waschpuffer: eisgekühlter Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4

7.5.3.4 Konkurrenzexperimente an humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 an Jurkat T- und primäre Lymphozyten-Membranpräparationen

Pipettierschema:

| | |
|---------|--|
| 25 µl | Tris50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 100 µM NECA in Tris50%/DMSO50% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in Tris50%/DMSO50% |
| 375 µl | 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | [³ H]MSX-2 (Endkonzentration 1 nM) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 500 µl | Proteinsuspension (50-100 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 1000 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 30 min bei Raumtemperatur

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter – vorinkubiert für 30 min in einer 0.3%igen PEI-Lösung zur Verminderung der unspezifischen Bindung am 48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4

7.5.3.5 Kompetitionsexperimente an humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren*Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-603 an rekombinanten CHO-hA_{2B}-Membranpräparationen*

Pipettierschema:

| | |
|--------|--|
| 50 µl | Tris90%/DMSO10% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM DPCPX in Tris90%/DMSO10% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in Tris90%/DMSO10% |
| 50 µl | [³ H]PSB-603 (Endkonzentration 0.3 nM, K _D =0.41 nM ¹⁷⁸) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | Proteinsuspension (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 200 µl | Endvolumen |

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-603 an Jurkat T- und primäre Lymphozyten-Membranpräparationen

Pipettierschema:

| | |
|---------|--|
| 25 µl | Tris50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM DPCPX in Tris50%/DMSO50% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in Tris50%/DMSO50% |
| 375 µl | 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | [³ H]PSB-603 (Endkonzentration 0.3 nM) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 500 µl | Proteinsuspension (50-100 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 1000 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 60 min bei Raumtemperatur

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter am 48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4 + 0.1% BSA

7.5.3.6 Konkurrenzexperimente an humanen Adenosin-A₃-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-11 an rekombinanten CHO-hA₃-Membranpräparationen

Pipettierschema:

| | |
|--------|---|
| 50 µl | Tris90%/DMSO10% (Gesamtbindung) bzw. 100 µM R-PIA in Tris90%/DMSO10% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in Tris90%/DMSO10% |
| 50 µl | [³ H]PSB-11 (Endkonzentration 1 nM, K _D =4.9 nM ¹⁹⁰) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | Proteinsuspension (75 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 200 µl | Endvolumen |

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-11 an Jurkat T- und primäre Lymphozyten-Membranpräparationen

Pipettierschema:

| | |
|---------|---|
| 25 µl | Tris50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 100 µM R-PIA in Tris50%/DMSO50% (unspezifische Bindung) |
| 375 µl | 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 100 µl | [³ H]PSB-11 (Endkonzentration 1 nM) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 500 µl | Proteinsuspension (50-100 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 |
| 1000 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 60 min bei Raumtemperatur

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter am 48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4

7.5.4 **Kompetitionsexperimente an intakten Zellen**

Bei Radioligand-Bindungsstudien an intakten Zellen ist prinzipiell darauf zu achten, dass nur antagonistisch wirksame Substanzen sowie Antagonist-Radioliganden getestet werden können, da bei Agonisten eine sehr schnelle Rezeptordesensibilisierung bzw. -internalisierung beobachtet werden kann und die Versuche somit nicht mehr auswertbar sind.

Die Abweichungen der Experimente an intakten Zellen von der Durchführung der Assays an Membranpräparationen werden im folgenden Abschnitt dargelegt: Für adhärente Zellen wird von den benötigten Zellkulturflaschen das Medium abdekantiert, die Zellen 2 x mit PBS (37°C) gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen werden pro Zellkulturflasche in 5 ml KRH-Puffer, 37°C aufgenommen, in Falcon-Tubes überführt und bei 200 x g, 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Dieser Waschschrift dient der Entfernung des noch vorhandenen Trypsins, da dieses normalerweise durch Enzyme, die über das FCS im Medium vorhanden sind, inaktiviert wird - in Puffer wird deshalb dieser Waschschrift nötig. Das benötigte Volumen an Suspensionszellen wird ebenfalls bei 200 x g, 4°C für 5 min abzentrifugiert. Die so erhaltenen Zellpellets werden in der im Assay benötigten Menge an KRH-Puffer, 37°C aufgenommen, mit ADA (1 I.U./ml Puffer) versetzt und für 30 min im Brutschrank ruhen gelassen, abzentrifugiert (200 x g, 4°C, 5 min), erneut in der im Assay benötigten Menge an KRH-Puffer, 37°C aufgenommen, wiederum mit ADA (1 I.U./ml Puffer) versetzt und für weitere 30 min im Brutschrank ruhen gelassen. Währenddessen pipettiert man in die Reaktionsvials die vorgeschriebene Menge Puffer, bedeckt alles gut mit Alufolie und stellt das Rack ebenfalls in den Brutschrank, damit sich Temperatur (und ggf. pH-Wert) genau einstellen können. Nun kann man Verdünnungsreihe und Radioligandlösung fertig stellen (Vorgehen siehe **Kapitel 7.5.2**, Kompetitionsexperimente - Durchführung), nach Ablauf der 2 h Inkubationszeit werden zunächst die Testsubstanzen und Radioligandlösung, zum Start der Reaktion die Zellsuspension in die Reaktionsvials zupipettiert, alles **vorsichtig** gevortext, mit Alufolie bedeckt und im Brutschrank inkubiert. Das weitere Vorgehen ist mit den Versuchen an den Membranpräparationen identisch (Vorgehen siehe **Kapitel 7.5.2**, Kompetitionsexperimente - Durchführung).

7.5.4.1 Konkurrenzexperimente an humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]DPCPX an intakten CHO-hA₁-Zellen

Pipettierschema:

| | |
|---------|---|
| 10 µl | DMSO100% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM DPCPX in DMSO100% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 790 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]DPCPX (Endkonzentration 10 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (3-4 konfluente Zellkulturflaschen 175 cm ² / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| 1000 µl | Endvolumen |

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]DPCPX an intakten primären Lymphozyten

Pipettierschema:

| | |
|--------|---|
| 10 µl | KRH50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM DPCPX in KRH50%/DMSO50% (unspez. Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 290 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]DPCPX (Endkonzentration 5 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (5x10 ⁷ – 1x10 ⁸ Zellen / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| 500 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 60 min im Brutschrank

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter am 24er/48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter KRH-Puffer

7.5.4.2 Konkurrenzexperimente an humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren*Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 an intakten CHO-hA_{2A}-Zellen*

Pipettierschema:

| | |
|---------|---|
| 10 µl | DMSO100% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM MSX-2 in DMSO100% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 790 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]MSX-2 (Endkonzentration 8 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (3-4 konfluente Zellkulturflaschen 175 cm ² / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| <hr/> | |
| 1000 µl | Endvolumen |

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 an intakten primären Lymphozyten

Pipettierschema:

| | |
|--------|---|
| 10 µl | KRH50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM MSX-2 in KRH50%/DMSO50% (unspez. Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 290 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]MSX-2 (Endkonzentration 5 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (5x10 ⁷ – 1x10 ⁸ Zellen / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| <hr/> | |
| 500 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 30 min im Brutschrank

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter - vorinkubiert für 30 min in einer 0.3%igen PEI-

Lösung zur Verminderung der unspezifischen Bindung am 24er/48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter KRH-Puffer

7.5.4.3 Konkurrenzexperimente an humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-603 an intakten CHO-hA_{2B}-Zellen

Pipettierschema:

| | |
|---------|---|
| 10 µl | DMSO100% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM DPCPX in DMSO100% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 790 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]PSB-603 (Endkonzentration 0.15 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (3-4 konfluente Zellkulturflaschen 175 cm ² / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| 1000 µl | Endvolumen |

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-603 an intakten primären Lymphozyten

Pipettierschema:

| | |
|--------|--|
| 10 µl | KRH50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 50 µM PSB-1115 in KRH50%/DMSO50% (unspez. Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 290 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]PSB-603 (Endkonzentration 0.2 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (5x10 ⁷ – 1x10 ⁸ Zellen / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| 500 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 45 min im Brutschrank

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter am 24er/48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter KRH-Puffer + 0.15% BSA

7.5.4.4 Konkurrenzexperimente an humanen Adenosin-A₃-Rezeptoren*Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-11 an intakten CHO-hA₃-Zellen*

Pipettierschema:

| | |
|---------|--|
| 10 µl | DMSO100% (Gesamtbindung) bzw. 100 µM R-PIA in DMSO100% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 790 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]PSB-11 (Endkonzentration 1 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (3-4 konfluente Zellkulturflaschen 175 cm ² / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| <hr/> | |
| 1000 µl | Endvolumen |

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-11 an intakten primären Lymphozyten

Pipettierschema:

| | |
|--------|--|
| 10 µl | KRH50%/DMSO50% (Gesamtbindung) bzw. 50 µM PSB-10 in KRH50%/DMSO50% (unspez. Bindung) bzw. Testsubstanzen in DMSO100% |
| 290 µl | KRH-Puffer, 37°C |
| 100 µl | [³ H]PSB-11 (Endkonzentration 1 nM) in KRH-Puffer |
| 100 µl | Zellsuspension (5x10 ⁷ – 1x10 ⁸ Zellen / 24-Vial-Rack) in KRH-Puffer |
| <hr/> | |
| 500 µl | Endvolumen |

Inkubationszeit: 45 min im Brutschrank

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter am 24er/48er-Harvester

Waschpuffer: eiskühler KRH-Puffer

7.5.5 [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien

[³⁵S]GTPγS-Radioligand-Bindungsstudien dienen zur funktionellen Untersuchung eines Liganden an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, also der Untersuchung seiner Charakteristik als Voll-, Partial- oder inverser Agonist bzw. als neutraler Antagonist.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³⁵S]GTPγS an rekombinanten CHO-hA₁-Membranpräparationen

Pipettierschema:

| | |
|--------|--|
| 10 µl | Tris80%/DMSO20% (Gesamtbindung) bzw. 10 µM GTPγS in Tris90%/DMSO10% (unspezifische Bindung) bzw. Testsubstanzen in Tris90%/DMSO10% |
| 150 µl | Inkubationspuffer* für [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien |
| 20 µl | [³⁵ S]GTPγS (Endkonzentration 0.1 nM) in Inkubationspuffer* für [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien |
| 20 µl | Proteinsuspension (5 µg/vial) in Inkubationspuffer* für [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien |
| 200 µl | Endvolumen |

* TRIZMA[®]-Base, NaCl, EDTA, MgCl₂, DTT, GDP und BSA, pH 7.4

Inkubationszeit: 60 min bei Raumtemperatur

Filtration über GF/B-Glasfaserfilter - vorinkubiert für 30 min in Waschpuffer - am 48er-Harvester

Waschpuffer: eisgekühlter Tris-Puffer, 50 mM pH 7.4 + 5 mM MgCl₂

Vor Beginn der Versuche wird eine 1:1000-Verdünnung des Radioliganden [³⁵S]GTPγS in 10 mM Tricin/1 mM Dithiothreitol (DTT) hergestellt, die in 1 ml-Aliquots bei -20°C gelagert wird. Da die Halbwertszeit von ³⁵S nur 87.4 Tage beträgt und damit relativ kurz ist, muss vor jedem Assay die gerade vorhandene spezifische Aktivität und Radioaktivkonzentration – ausgehend von definierten Werten an einem Kalibrierdatum – berechnet werden. Zunächst wird die seit dem Kalibrierdatum bereits vergangene Anzahl an Tagen berechnet:

Assaydatum – Kalibrierdatum = d, Zerfallsfaktor $D_f=0.9921^d$

Die Radioaktivkonzentration zum Zeitpunkt d berechnet sich dann wie folgt:

$$c \text{ [Ci/l]} \text{ am Tag d } (c_d) = c \text{ [Ci/l]} \text{ am Kalibrierdatum } (c_k) \times D_f$$

Unter Berücksichtigung der anfänglichen 1:1000-Verdünnung des Radioliganden ergibt sich $c_d/1000$. Die zum Zeitpunkt d vorhandene spezifische Aktivität (SA_d) kann man dann wiederum unter Zuhilfenahme der spezifischen Aktivität am Kalibrierdatum (SA_k) und dem Zerfallsfaktor (D_f) berechnen:

$$SA_d \text{ [Ci/mmol]} = \frac{D_f}{\frac{1}{SA_k \text{ [Ci/mmol]}} - \frac{(1 - D_f)}{1498}}$$

Hergestellt werden soll eine Radioligandlösung der Konzentration 0.2 nM:

$$V_{RL} = \frac{n_{\text{Vials}} \times 0.2 \text{ nM} \times SA_t \text{ [Ci/mmol]} \times V_{\text{ges/Vial}} \text{ [ml]}}{c_d \text{ [mCi/ml]}}$$

$$V_{RL} = X \times \frac{\text{nmol} \times 1000 \text{ mCi} \times \text{ml} \times \text{ml}}{1000 \text{ ml} \times 1000000 \text{ nmol} \times \text{mCi}}$$

$$V_{RL} = X \times 10^{-6} \text{ ml} = X \times 10^{-3} \mu\text{l}$$

Die weiteren Berechnungen und Durchführung des Assays erfolgt analog zu den Beschreibungen für Konkurrenzexperimente, beschrieben in **Kapitel 7.5.2**.

Die Auswertung der Experimente erfolgt mit den Computerprogrammen Microsoft Excel[®] und Graphpad PRISM[®]. Zuerst wird der Mittelwert der Gesamtbindung vom Mittelwert der unspezifischen Bindung subtrahiert. Der so erhaltene Zahlenwert in cpm wird als 100% und die unspezifische Bindung als 0% gesetzt. Die spezifische Bindung in Anwesenheit der Testsubstanz (Differenz Gesamtbindung – unspezifische Bindung) wird auf den Basalwert 100% bezogen und erneut normalisiert, wobei der bisherige 100%-Basalwert als 0% gesetzt wird und die Werte für mitgetestete Vollagonisten bzw.

volle inverse Agonisten 100% bzw. -100% darstellen. Die so erhaltenen Prozentwerte werden dann gegen die jeweilige Testsubstanzkonzentration aufgetragen.

Aus diesen Experimenten lässt sich der EC_{50} -Wert berechnen, der die Konzentration der Testsubstanz angibt, die 50% des vollen Effektes einer Testsubstanz bewirkt.

7.6 Proliferationsassay

Eine wichtige Technik zur Bestimmung biologischer Antworten humaner Lymphozyten auf verschiedene Stimuli ist die Bestimmung derer proliferativen Antworten auf diese Stimuli. Sehr einfach gesagt bedeutet das, dass die Zellzahl einer Kultur vor und nach Zugabe einer potentiell stimulierenden Substanz gemessen wird - dies kann jedoch sehr aufwändig und schwierig sein, da die untersuchten Zellen nur einen Bruchteil der gesamten Zellpopulation darstellen. Deshalb wird die Zellproliferation in der Praxis durch Messung des in die DNA eingebauten [^3H]Thymidin bestimmt, ein Vorgang, der in sehr nahem Zusammenhang mit der Änderung der Zellzahl steht.²⁵⁸ Das vorliegende Protokoll wurde mit Modifikationen aus den *Current Protocols in Immunology* übernommen.²⁵⁸

7.6.1 Durchführung des Proliferationsassays mit [^3H]Thymidin

Der Assay wird im 48-Vial-Format durchgeführt, dafür müssen vor Beginn des Assays ausreichend sterile 4 ml-PE-Vials zur Verfügung stehen. Diese können in einem Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisiert werden.

Zunächst werden die Verdünnungsreihen der zu testenden Substanzen in sterilem aqua bidest90%/DMSO10% (entspricht einer DMSO-Endkonzentration von 0.2 % im Assay) hergestellt, die Zellen gezählt und auf die für den Assay benötigte Zellzahl/ml verdünnt bzw. durch Zentrifugation (200 x g, 4°C, 5 min) konzentriert und das benötigte Volumen an PHA-Lösung aufgetaut. Die Pipettierschemata sehen dabei wie folgt aus:

Proliferationsassay mit [^3H]Thymidin an intakten primären Lymphozyten

| | |
|--------|--|
| 10 µl | Testsubstanzen in sterilem H ₂ O90%DMSO10% |
| 50 µl | PHA-Lösung (10 µg/ml Endkonz.) bzw. VLE-RPMI-Medium (-FCS +PS) |
| 340 µl | VLE-RPMI-Medium (+FCS +PS), 37°C |
| 100 µl | Zellsuspension (1x10 ⁵ Zellen / Vial) in VLE-RPMI-Medium (+FCS +PS) |
| 500 µl | Endvolumen |

Proliferationsassay mit [³H]Thymidin an Jurkat T-Zellen

| | |
|---------|---|
| 10 µl | Testsubstanzen in sterilem H ₂ O 90% DMSO 10% |
| 100 µl | PHA-Lösung (10 µg/ml Endkonz.) bzw. RPMI-Medium (-FCS +PS +Glu) |
| 790 µl | RPMI-Medium (+FCS +PS +Glu), 37°C |
| 100 µl | Zellsuspension (1x10 ⁴ Zellen / Vial) in RPMI-Medium (+FCS +PS +Glu) |
| 1000 µl | Endvolumen |

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden Zellen für 5 min bei 99°C erhitzt und damit abgetötet und diese Zellsuspension in den Assay eingesetzt (ohne Testsubstanzzugabe). Bei den Assays wird jeweils in Triplikaten gearbeitet, jeder Versuch wird dreimal voneinander unabhängig durchgeführt.

Die Ansätze werden für 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit werden 10 µl des radioaktiv markierten [³H]Thymidin, 0.5 µCi/Vial im jeweiligen Medium (primäre Lymphozyten: VLE-RPMI-Medium (+FCS +PS), Jurkat T: RPMI-Medium (+FCS +PS +Glu)) hinzupipettiert und die Racks weitere 8 h im Brutschrank inkubiert, um die Radioaktivität in die DNA einbauen zu lassen. Nach Ablauf dieser zweiten Inkubationszeit wird der Versuch gestoppt, indem er mit einem Zellharvester über angefeuchtete Glasfaserfilter (GF/B) filtriert wird, es wird mindestens 5 mal mit eiskaltem aqua bidest nachgespült. Dabei werden die Zellen lysiert und die DNA mit der daran gebundenen Radioaktivität auf dem Filter zurückgehalten und diese somit von der freien, nicht eingebauten Radioaktivität getrennt. Die Filterplättchen werden ausgestanzt, in Szintillationsvials überführt und mit 2.5 ml Szintillationscocktail (Ultima-Gold® bzw. ReadySafe™) versetzt. Nach einer Präinkubation von 9 h wird die Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt.

Die Auswertung der Versuche erfolgt mit Hilfe des Computerprogrammes Graphpad PRISM®, dabei wurden der cpm-Mittelwert der Kontrolle – also jeweils ohne Zugabe von Testsubstanzen, diese wurden durch Medium ersetzt – jeweils für den unstimulierten und PHA-stimulierten Ansatz als 100% gesetzt, für den 0%-Wert wurden die cpm-Werte aus den Vials mit den vorher abgetöteten Zellen eingesetzt. Die cpm-Werte aus den Versuchen mit Testsubstanzzugabe können nun in diese %-Skala normalisiert werden.

7.6.2 FACS-Messungen

Diese Versuche wurden im Labor der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Knolle, Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie (IMMEI), Universitätsklinikum der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Nach erfolgreicher Etablierung des Proliferationsassays mit [^3H]Thymidin an primären Lymphozyten sollten die Ergebnisse mittels einer weiteren Methode verifiziert werden. Dafür wurden durchflusszytometrische Messungen an einem FACS-(fluorescence activated cell sorting)-Gerät durchgeführt. Durchflusszytometrie ist eine Methode, die multiple physikalische Eigenschaften misst und gleichzeitig analysiert, die einzelne Partikel – in der Regel handelt es sich um Zellen – zeigen, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom einen (Laser-)Lichtstrahl passieren. Bei den gemessenen physikalischen Eigenschaften kann es sich z.B. um die relative Partikelgröße, die Granularität bzw. interne Komplexität oder die relative Fluoreszenzintensität handeln. Für die Messung werden die Partikel in einem Flüssigkeitsstrom zur Lasereinheit transportiert, wobei Partikel der Größe 0.2 μm bis 150 μm gemessen werden können – wichtig ist dabei, dass sie den Laserstrahl einzeln passieren können, also vorher (durch vortexen) gut vereinzelt wurden. Passieren die Partikel nun den Laserstrahl, wird dieser gestreut; sind fluoreszierende Moleküle vorhanden, so werden diese angeregt. Das gestreute Laserlicht und evtl. emittierte Fluoreszenz wird über geeignete Detektionsmodule – denen spezielle Filter vorgeschaltet werden können – erfasst und in elektronische Signale umgewandelt, die proportional zu den optischen Signalen sind, durch die sie ausgelöst wurden.

7.6.2.1 Zellmarkierung mit CFSE

5(6)-Carboxyfluorescein-diacetat-N-Succinimidylester (CFSE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der passiv in das Zellinnere eindringt und dort irreversibel an Zellproteine bindet. Sobald zelluläre Esterasen den Ester hydrolysieren, beginnt er zu fluoreszieren. Die so entstandene Fluoreszenz hält in ruhenden Zellen über Monate an und ihre Intensität halbiert sich in proliferierenden Zellen bei jeder Teilung. Quantifiziert man nun die Fluoreszenz einer einzelnen Zelle mit dem FACS-Gerät nach der gewünschten Inkubati-

onszeit, so lassen sich Rückschlüsse ziehen, wie oft/wie schnell die Zellen proliferieren bzw. im welchem Proliferationszyklus sie sich befinden.

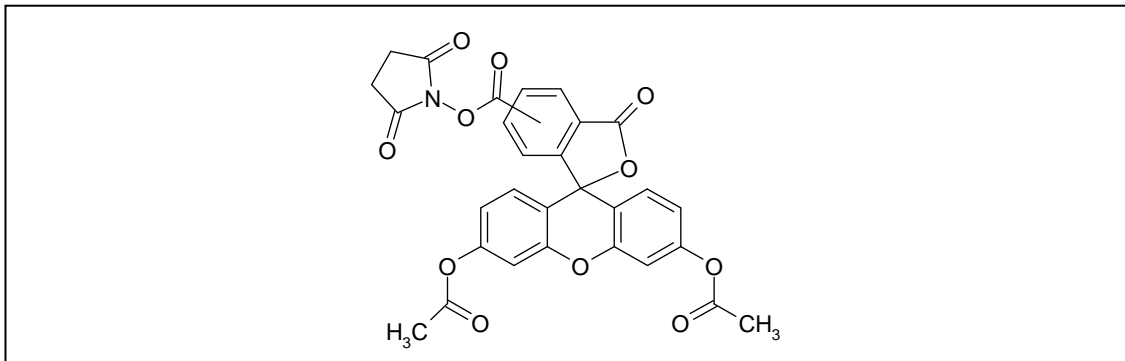


Abb. 7-69: Chemische Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE

Die zu markierenden primären Zellen werden vom Medium getrennt (Zentrifugation bei 400 x g, 4°C für 5 min), in ca. 45 ml PBS-Puffer (37°C) aufgenommen, gewaschen (400 x g, 4°C für 5 min) und in 1 ml PBS-Puffer (37°C) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 µl CFSE wird die Suspension vorsichtig gevortext und für 10 min im Brutschrank inkubiert, wobei immer wieder leicht geschüttelt wird. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Suspension ad 50 ml mit FCS (37°C) aufgefüllt, 1 x mit PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugeneinstellungen wie oben), die Zellen im benötigten Volumen Medium aufgenommen und in den Assay eingesetzt.

Das Pipettierschema sieht wie folgt aus, analog zum Pipettierschema des Proliferationsassays mit [³H]Thymidin:

Proliferationsassay CFSE an intakten primären Lymphozyten

| | |
|--------|---|
| 50 µl | PHA-Lösung (10 µg/ml Endkonz.) bzw. VLE-RPMI-Medium (-FCS +PS) |
| 350 µl | VLE-RPMI-Medium (+FCS +PS), 37°C |
| 100 µl | CFSE-markierte Zellsuspension (1x10 ⁵ Zellen/Vial) in VLE-RPMI-Medium (+FCS +PS) |
| 500 µl | Endvolumen |

Der Versuch wird für 48 h + 8 h (analog dem Proliferationsassay mit [^3H]Thymidin) im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird er durchflusszytometrisch am FACS vermessen.

7.7 Real-time-PCR

Teile dieser Versuche wurden im Labor der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Eltzhig, Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, nach der dort etablierten Methode durchgeführt,²¹³ weitere Messungen erfolgten im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Famulok im Life & Medical Sciences (LIMES)-Institut, Abteilung chemische Biologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Die Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time-PCR, qPCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird durch das Real-time-Verfahren mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während jedem PCR-Zyklus zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht^{170,171} – die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Somit wird es ermöglicht, Aussagen über die Ausgangsmenge an (c)DNA zu treffen.^{337,338} Bei der qPCR wird ein Thermocycler eingesetzt, der ein optisches Detektionsmodul zur Messung von Fluoreszenz enthält.³³⁹ Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in der vorliegenden Arbeit SYBR®Green verwendet, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet und dabei unspezifisch in die Windungen eingebaut wird,³⁴⁰ dadurch steigt seine Fluoreszenz an.

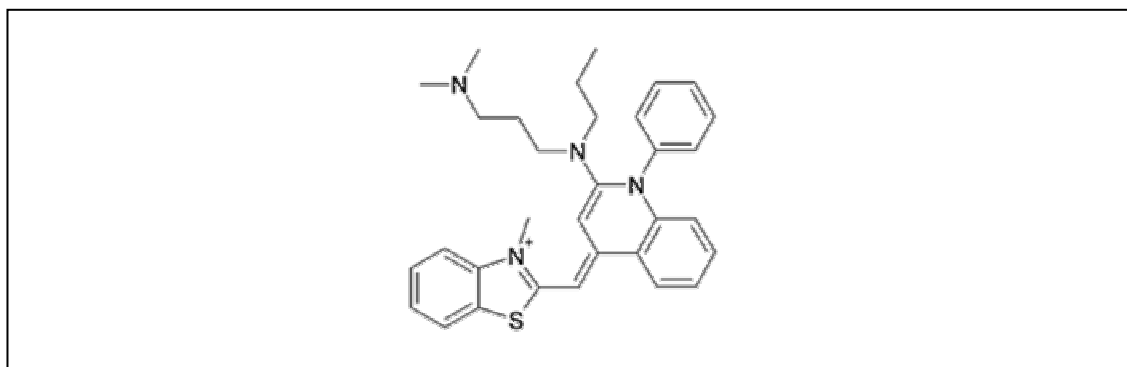


Abb. 7-70: Chemische Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green

In gebundenem Zustand fluoresziert SYBR®Green nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 497 nm, die Emissionswellenlänge beträgt dabei 520 nm.^{337,338} Die Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus bestimmt und nach Beendigung des gesamten Laufes

ergibt die Aneinanderreihung der einzelnen Fluoreszenzwerte eine sigmoide Amplifikationskurve, die dann zur Auswertung herbeigezogen wird.

7.7.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe der Reaktionskits NucleoSpin[®] RNAII, Macherey-Nagel und Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™], Invitrogen nach Angaben der Hersteller. Es wurden dafür 5×10^7 Jurkat T-Zellen und 1×10^9 primäre Lymphozyten eingesetzt.

7.7.2 Quantifizierung der isolierten RNA

Die Quantifizierung der isolierten RNA wird mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt,³⁴¹ dabei wird die Absorption durch die in der RNA vorhandenen Basen gemessen. Dafür werden 5 µl der isolierten RNA-Suspension + 495 µl aqua bidest (1:100) verdünnt, in Quarzküvetten überführt und im Photometer die OD-Werte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei berechnet sich der RNA- bzw. DNA-Gehalt nach folgenden Formeln:

1 OD bei 260 nm für doppelsträngige DNA = 50 ng/µl doppelsträngige DNA

1 OD bei 260 nm für einzelsträngige DNA = 20 – 33 ng/µl einzelsträngige DNA

1 OD bei 260 nm für RNA = 40 ng/µl RNA

Diese Werte müssen mit dem Verdünnungsfaktor, mit dem die RNA-Probe für die Messung verstreckt wurde, multipliziert werden (x 100) und man erhält die tatsächlich in der Probe vorhandene RNA-Konzentration. Aus den RNA-Proben werden nun das Volumen, in dem sich 1 µg RNA befindet, herauspipettiert und mit RNase-freiem Reinstwasser auf das für die Transkription in cDNA notwendige Volumen aufgefüllt.

Die Werte aus der Messung bei 280 nm geben zusätzlich Auskunft über die Reinheit der Probe und eventuellen Verunreinigungen mit Proteinen, Phenol, Agarose oder anderen Nukleinsäuren. Dazu errechnet man das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} einer RNA-Probe.³⁴² Dieses Verhältnis sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen, um eine ausreichende Reinheit zu gewährleisten, bei Verunreinigungen ist dieser Wert deutlich kleiner und eine Konzentrationsbestimmung der RNA-Probe ist nicht ohne weiteres möglich.

7.7.3 Transkription der isolierten RNA in cDNA

Der Umschrieb von RNA in cDNA wurde mit Hilfe der Reaktionskits iScriptTMcDNA Synthesis Kit von BioRad und Omniscript[®] Reverse Transcription von Qiagen nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Dafür wurden 1 µg RNA absolut eingesetzt. Für weitere Berechnungen ist hierbei zu beachten, dass die erhaltenen cDNA-Fragmente einzelsträngig sind, da die korrespondierenden mRNA-Stränge am Schluss der Transkription durch RNAsen eliminiert werden. Die erhaltene cDNA beträgt demnach bei eingesetzten 1 µg RNA auch 1 µg cDNA, gelöst im jeweiligen Volumen des Transkriptionsansatzes. Dieses wird dann mit nuklease-freiem Wasser ad 80 µl aufgefüllt, sodass sich daraus eine cDNA-Lösung der Konzentration 12.5 ng/µl ergibt.

7.7.4 Referenzgene

Da innerhalb einer Zelle nicht alle vorhandenen Gene gleichzeitig transkribiert werden, existieren einerseits Zelltyp-spezifische Gene (wie zum Beispiel viele Gene, die für Rezeptoren kodieren) und andererseits so genannte Haushalts- oder Referenzgene (oft auch als „Housekeeping Genes“ bezeichnet); Gene, die praktisch in jeder Zelle abgeschrieben werden und die essentiell für den Erhalt der Zellfunktionen sind, z.B. am Grundstoffwechsel beteiligt sind. Sie werden ubiquitär, konstitutiv exprimiert und ihre Transkription ist nicht reguliert, also nicht von experimentellen Bedingungen sowie von Zelltyp und Zellstadium abhängig.^{343,344} In der vorliegenden Arbeit wurde mit β -Aktin als Referenzgen gearbeitet, alle Ergebnisse der untersuchten Zielgene werden zur relati-

ven Quantifizierung auf die Expressionsrate von β -Aktin bezogen. Ein weiteres, weit verbreitetes Referenzgen ist Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

7.7.5 Verwendete Primer

Ausgehend von der Sequenz der zu untersuchenden Gene wurden verschiedene Primersequenzen ermittelt. Dabei sind die Forward-Primer jeweils analog zur Gensequenz, die Reverse-Primer sind komplementär zur umgekehrten Gensequenz.

| Primer | Sequenz | T _m |
|---------------------------|-------------------------------|----------------|
| hA ₁ -forward | TGC ACT GGC CTG TTC TGT AG | 62°C |
| hA ₁ -reverse | CTG CCT CTC CCA CGT ACA AT | 62°C |
| hA _{2A} -forward | GGA GTT TGC CCC TTC CTA AG | 62°C |
| hA _{2A} -reverse | CTG CTT CCT CAG AAC CCA AG | 62°C |
| hA _{2B} -forward | ATC TCC AGG TAT CTT CTC | 52°C |
| hA _{2B} -reverse | GTT GGC ATA ATC CAC ACA G | 56°C |
| hA ₃ -forward | CCT TCT CGC GTG TCC TGA CT | 64°C |
| hA ₃ -reverse | CTC TGA CTA CCG CCG TTG CT | 64°C |
| h β -Aktin-forward | GGT GGC TTT TAG GAT GGC AAG | 64°C |
| h β -Aktin-reverse | ACT GGA ACG GTG AAG GTG ACA G | 68°C |

Die Primer werden in nuklease-freiem Wasser zu einer Konzentration von 100 pmol/ μ l gelöst. Aus Forward- und Reverse-Primer für ein Gen wird ein Primer-Mix hergestellt, indem 20 μ l Forward-Primer (100 pmol/ μ l) + 20 μ l Reverse-Primer (100 pmol/ μ l) + 160 μ l nuklease-freies Wasser zusammenpipettiert werden. Die Konzentration der einzelnen Primer im Mix liegt dann bei 10 pmol/ μ l.

7.7.6 Durchführung der Real-time-PCR

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte werden auf Eis durchgeführt.

Für jede zu untersuchende Probe wird eine cDNA-Verdünnungsreihe hergestellt. Da pro Well jeweils 4 µl eingesetzt werden und die Verdünnungsreihe für die fünf zu untersuchenden Gene - hier A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ und β-Aktin (n_{Gene} = 5) - ausreichend sein muss, ergeben sich folgende Volumina:

| | | | | |
|--|-------------------|-----------------------------|--------|--------------|
| $n_{\text{Gene}} \times 4 \mu\text{l} =$ | cDNA unverdünnt | | → 1:1 | 50 ng/Well |
| | X µl cDNA unverd. | + X µl PCR-H ₂ O | → 1:2 | 25 ng/Well |
| | X µl cDNA 1:2 | + X µl PCR-H ₂ O | → 1:4 | 12.5 ng/Well |
| | X µl cDNA 1:4 | + X µl PCR-H ₂ O | → 1:8 | 6.25 ng/Well |
| | X µl cDNA 1:8 | + X µl PCR-H ₂ O | → 1:16 | 3.13 ng/Well |

Nun wird für jedes zu untersuchende Gen (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ und β-Aktin) ein PCR-Mix hergestellt. Dabei wird nach folgendem Schema vorgegangen: Für jede zu untersuchende cDNA (n_{cDNA}) müssen fünf Wells berechnet werden (siehe Verdünnungsreihe) und zusätzlich werden in 2 Wells der Leerwert bestimmt, in den keine cDNA pipettiert wird, um evtl. störende Kontaminationen zu entdecken [n_{wells} = (n_{cDNA} × 5) + 2 Leerwert + 1 Zuschlag].

| | | | | | |
|--------------------|---|---------|---|------|-------------------------|
| n _{wells} | x | 12.5 µl | → | X µl | SYBR [®] Green |
| n _{wells} | x | 7.5 µl | → | Y µl | PCR-H ₂ O |
| n _{wells} | x | 1 µl | → | Z µl | Primermix (siehe oben) |
| n _{wells} | x | 21 µl | → | E µl | Endvolumen |

Nun kann die Real-time-PCR zusammenpipettiert werden, in jedes Well der 96-Well-Platte wird dabei 4 µl der cDNA (unverdünnte Lösung der Konzentration 12.5 ng/µl entspricht 50 ng eingesetzte cDNA absolut bzw. die entsprechende Verdünnung, siehe oben) und 21 µl des hergestellten PCR-Mixes in die Wells für die zu untersuchenden Gene pipettiert, es ergibt sich somit ein Gesamtvolumen pro Well von 25 µl. Die Platte kann nun zügig mit der Siegelfolie verschlossen werden, kurz in der Zentrifuge mit der „Pulse“-Funktion (kurzes Hochfahren für ein paar Sekunden bei 1000 x g um den gesamten Wellinhalt auf den Wellboden zu befördern) zentrifugiert und direkt in den

Thermo-cycler mit Fluoreszenzmodul eingebracht und die PCR nach folgendem Protokoll gestartet werden:

| Zyklus | Anzahl der Wiederholungen | Temperatur | Dauer [min] |
|--|---------------------------|------------|-------------|
| 1 | 1 x | 95°C | 3:00 |
| 2 | 40 x | 95°C | 0:15 |
| | | 58°C | 0:30 |
| | | 72°C | 0:10 |
| 3 | 1 x | 72°C | 1:00 |
| 4 | 98 x | 51°C | 0:10 |
| Nach der zweiten Zyklus-Wiederholung wird die Temperatur pro Zyklus um 0.5°C zur Ermittlung der Schmelzkurve erhöht. | | | |
| 5 | 1 x | 25°C | DAUER |

7.7.7 Auswertung der Real-time-PCR

Die Auswertung der Real-time-PCR erfolgt mit Hilfe der gewonnenen sigmoiden Amplifikationskurven (siehe **Abb. 7-71**).

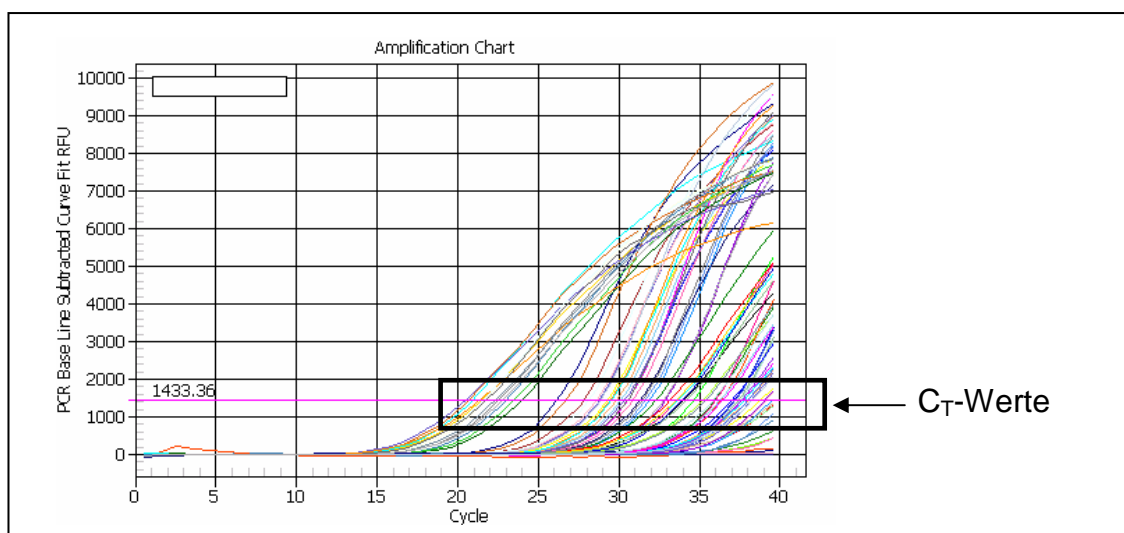


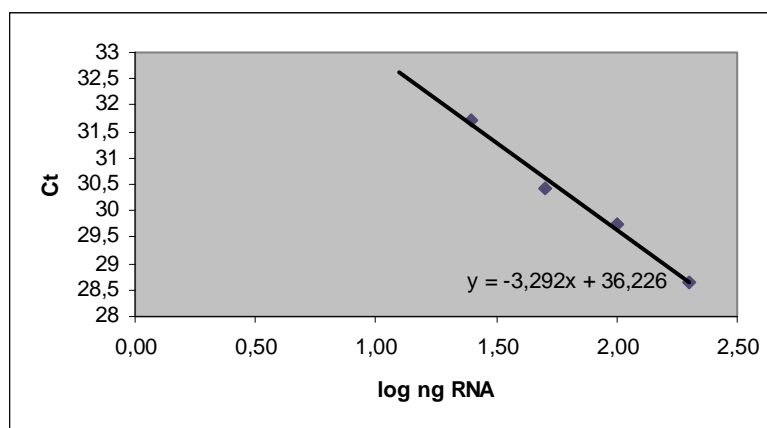
Abb. 7-71: Beispiel-Amplifikationskurven einer Real-time-PCR zur Berechnung der C_T-Werte

Zur Auswertung der Kurven werden diese auf einen Zahlenwert reduziert, den sogenannten C_T -Wert („Cycle Threshold Value“) – dieser gibt die Zykluszahl an, bei welcher eine Amplifikationskurve durch Übergang in die exponentielle Phase einen Schwellenwert („Cycle Threshold“) überschreitet, also erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Ein großer C_T -Wert deutet demnach auf eine geringe mRNA-Menge hin.

Die weitere Auswertung der Experimente erfolgt mit den Computerprogrammen Microsoft Excel®, Graphpad PRISM® und Gene Expression Analysis for iCycler iQ®, BioRad.

7.7.7.1 Bestimmung der PCR-Effizienz

Die PCR-Effizienz gibt an, wieviel Target-cDNA während der Annealing-Elongationsphase verdoppelt wird, sie ist also wichtig für die präzise Quantifizierung der Real-time-PCR - bei einer optimalen Effizienz von 100% verdoppelt sich die Menge an PCR-Produkt pro Zyklus. Zur Berechnung der Effizienz werden die C_T -Werte der Verdünnungsreihe einer jeden cDNA-Probe benötigt. Diese werden linear gegen den dekadischen Logarithmus der zugehörigen RNA-Konzentration aufgetragen:



Mit Hilfe der Steigung dieser Geraden lässt sich dann die Effizienz nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Effizienz} = 10^{\left(- \frac{1}{\text{Steigung}} \right)}$$

Beträgt die Steigung der resultierenden Geraden -3.333 , so beträgt die Effizienz 100%. Um aussagekräftige Ergebnisse aus der Real-time-PCR zu erhalten, sollten die Effizienzen im Bereich zwischen 80% und 120% liegen und für die Primerkombinationen der Ziel- und Referenzsequenzen annähernd gleich sein.³⁴²

7.7.7.2 Schmelzkurvenanalyse

Nach erfolgreicher Fertigstellung der PCR wird damit eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die erhaltenen Fragmentlängen und damit die Spezifität zu bestimmen. Dafür wird nach Ablauf der PCR die produzierte DNA wieder aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam in jedem Zyklus um 0.5°C erhöht wird (von 51°C auf 95°C). Wird der produktspezifische Schmelzpunkt im Verlauf dieser Temperaturerhöhung erreicht (hängt von der Länge des Fragments und dem Gehalt an Cytosin-Guanin-Basenpaaren ab), kommt es zu einem steilen Fluoreszenzabfall, da durch das Aufschmelzen der DNA der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt wird. Durch Einschätzung dieses Temperaturwertes lassen sich dann spezifisches PCR-Produkt von z.B. unspezifisch entstehenden Primerdimeren unterscheiden, die meistens eine wesentlich niedrigere Schmelztemperatur aufweisen. Im Idealfall sollte bei der Schmelzkurvenanalyse ein einziger, scharfer Peak bei der vorher berechneten, spezifischen Schmelztemperatur des gewünschten PCR-Produktes zu sehen sein, sind mehrere Peaks vorhanden kann man davon ausgehen, dass die PCR nicht einwandfrei funktioniert hat.

7.7.7.3 Standardkurven- und C_T -Methode

Die eigentliche Auswertung erfolgt dann mittels der Standardkurven- und der C_T -Methode.^{345,346} Neben den zu untersuchenden Proben werden serielle Verdünnungsreihen der zu untersuchenden cDNA-Proben hergestellt und daraus die Effizienzen berechnet (siehe oben). Mit Hilfe dieser Effizienzen können nun die C_T -Werte normalisiert werden und die „tatsächlichen“ C_T -Werte berechnet werden, die für eine genaue Verdopplung der cDNA (Effizienz = 100%) stehen. Diese normalisierten C_T -Werte werden dann in Bezug auf β -Aktin (in %) dargestellt. Zur Berechnung der x-fachen

dann in Bezug auf β -Aktin (in %) dargestellt. Zur Berechnung der x-fachen Änderung des mRNA-Transkripts wird die C_T -Methode angewandt:

Dabei werden zuerst die C_T -Werte berechnet:

$$C_T(\beta\text{Act}) - C_T(\text{Gen1}) \text{ für cDNA-Probe1} = C_{T1}$$

$$C_T(\beta\text{Act}) - C_T(\text{Gen1}) \text{ für cDNA-Probe2} = C_{T2}$$

und diese dann folgendermaßen ins Verhältnis gesetzt:

$$C_T = 2^{-(C_{T1} - C_{T2})}$$

Das Ergebnis wird als x-fache Änderung („Fold change“) ausgedrückt und beschreibt die Expressionsrate von Gen1 in cDNA1 als Vielfaches der Expressionsrate von Gen1 in cDNA2, bezogen auf die Expressionsrate von β -Aktin.

7.8 Fluorimetrische Calcium-Messungen

7.8.1 Einstellungen des Gerätes FLUOStar Galaxy

| | |
|---------------------------------|---|
| Anregungswellenlänge | 485 nm, Bandbreite 25 nm |
| Emissionswellenlänge | 520 nm, Bandbreite 20 nm |
| Anzahl der Blitze (Validierung) | 10 (20) |
| Gain | Variabel |
| Intervallanzahl (Validierung) | 256 (Maximum) |
| Intervallzeit | 0.4 s |
| Injektionszeitpunkt | 1.6 s |
| Injektionsgeschwindigkeit | 310 $\mu\text{l/s}$ |
| Positionsverzögerung | 0.5 s |
| Temperatur | 30°C |
| Zellzahl / Well | Jurkat T: 2×10^5 primäre Lymphozyten: 5×10^6 |

7.8.2 Versuchsdurchführung: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung

Die Versuche wurden mit Jurkat T-Zellen und primären nativen Lymphozyten wie folgt durchgeführt:³⁴⁷⁻³⁴⁹ Das benötigte Volumen an Zellsuspension (Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und Volumen ausgerechnet, in dem die gewünschte Zellzahl vorhanden ist, bei Jurkat T-Zellen: 2×10^5 Zellen/Well, bei primären Lymphozyten: 5×10^6 Zellen/Well) wird in 50 ml-Falcontubes überführt und das Medium bei 200 x g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml vorgewärmtem KHP-Puffer resuspendiert und vorsichtig in ein Eppendorftube umpipettiert, in dem sich ein

3 µl OregonGreen(1mM)-Aliquot befindet. Bei Versuchen mit Jurkat T-Zellen werden außerdem 3 µl Pluronic-Lösung zupipettiert, welches die Zellwände permeabler für den Farbstoff macht und dieser dadurch besser in das Zellinnere eindringen kann. Das Zell-Farbstoffgemisch wird nun 60 min unter Lichtausschluss mit ständiger Bewegung (auf dem Bakterienrad) inkubiert. Während dieser Inkubationszeit kann der Farbstoff Oregon Green BAPTA-1TM – ein von Fluorescein abgeleitetes Molekül mit verbesserter Photostabilität (siehe auch **Abb. 7-72**) – als lipophiler Ester die Zellmembran passieren und wird im Zellinneren durch zelluläre Esterasen gespalten.

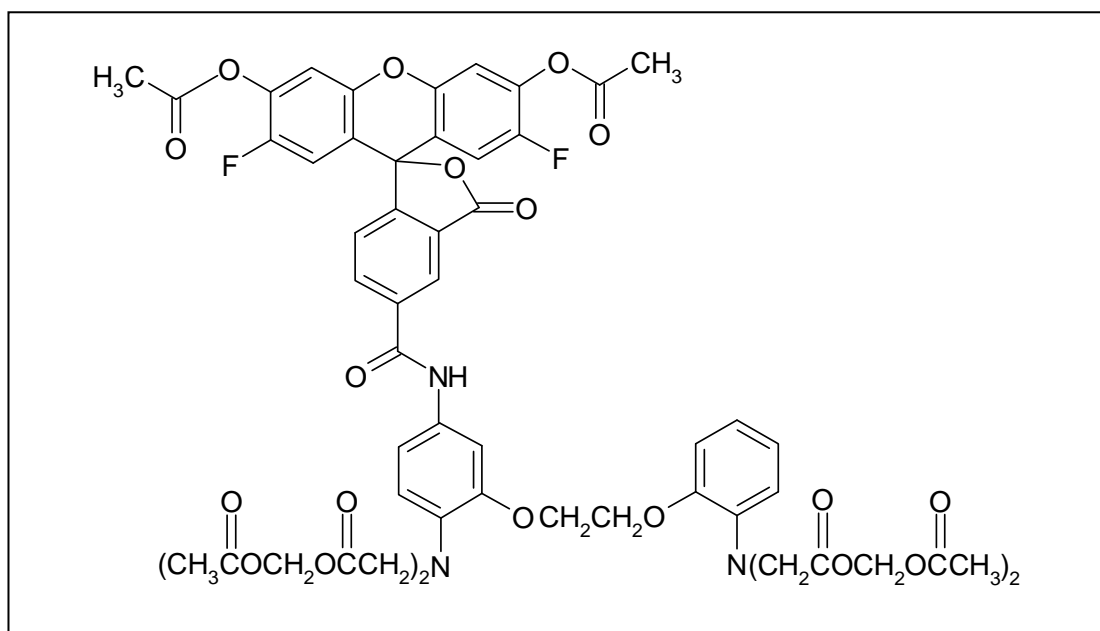


Abb. 7-72: Chemische Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green[®] 488 Bapta-1 AM

Der Farbstoff liegt nun unter physiologischen Bedingungen geladen vor (deprotonierte freie Säure) und kann so die Zelle nicht mehr durch Diffusion verlassen und ist damit im Cytosol gefangen („Ion Trap“). Nach der Inkubation muss der noch im Extrazellulär-raum befindliche Farbstoff ausgewaschen werden, dafür wird die Zellsuspension zweimal mit je 1 ml vorgewärmtem KHP-Puffer zentrifugiert (500 x g, 4°C, jeweils für wenige s hochbeschleunigt), um dann mit der für den Versuch notwendigen Menge an Puffer versetzt und in die Wells der 96-Well-Platte pipettiert zu werden. Zur Testung auf Agonismus werden pro Well 180 µl Zellsuspension vorgelegt und 20 µl der Testsubstanz (-Verdünnungsreihe) in 100% KHP verdünnt, nach Einstellung des Gerätes (siehe unten) injiziert (Testung in Triplikaten). Zur Testung auf Antagonismus werden 20 µl der Antagonist-Testsubstanz (-verdünnung, in KHP) und 160 µl Zellsuspension vorge-

legt und 10 min inkubiert. Nun kann – nach Einstellen des Gerätes, siehe unten - mit der Injektion von 20 µl Agonist-Lösung (in KHP) begonnen werden. Dabei bilden die zu messenden, über Agonist-induzierte Rezeptoraktivierung freigesetzte Ca^{2+} -Ionen mit dem Farbstoff einen Chelatkomplex, durch diese Komplexbildung ändert sich das Fluoreszenzverhalten des Farbstoffes und es ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenz messbar.

Hierbei muss beachtet werden, dass bereits eine DMSO-Endkonzentration von 1% geringfügige Effekte auslöst (Rezeptor-unabhängige Anstiege der Fluoreszenz) und eine DMSO-Konzentration von 2.5% wegen auftretender toxischer Effekte auf die Zellen nicht überschritten werden sollte.

Nach einer 10 min Inkubation der Zellen in der Mikrotiterplatte im auf 30°C-vorgeheizten Fluorimeter wird der Gain so eingestellt, dass die Grundfluoreszenz im Bereich zwischen 28,000 und 32,000 Fluoreszenzeinheiten liegt. Die Injektion der (Agonist-)Testlösungen erfolgt nun automatisch über Anwahl der Ziel-Wells in der Software. Nach Abschluss der Messung muss die Pumpe mit Ethanol zur Vermeidung von evtl. Kontaminationen gespült werden.

7.9 Statistische Berechnungen

Alle dargestellten Ergebnisse wurden – soweit nicht anders gekennzeichnet – aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) jeweils in Dreifachbestimmung gewonnen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde ein ungepaarter Student's t -Test durchgeführt (two-tailed), wobei die dargestellten Symbole folgende Bedeutung besitzen: ns = nicht signifikant ($P > 0.05$); * = signifikant ($P < 0.05$); ** = sehr signifikant ($P < 0.01$) und *** = äußerst signifikant ($P < 0.001$).

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AC | Adenylatcyclase |
| ADA | Adenosindesaminase |
| Ado | Adenosin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Ag | Antigen |
| ALL | Akute lymphozytische Leukämie |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) |
| AR | Adenosinrezeptor |
| ARNO | <i>ADP-ribosylation factor nucleotide site opener</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B _{max} | maximale Anzahl der (spezifischen) Bindungsstellen |
| Bq | Becquerel (Anzahl der Atome, die pro Sek. zerfallen, 1 Bq = 1/s) |
| BRET | Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| CADO | 2'-Chloradenosin |
| cAMP | cyclisches Adenosin-5'-monophosphat |
| CCPA | 2-Chlor-N ⁶ -cyclopentyladenosin |
| CCK2 | Cholecystokinin2-Rezeptor |
| CD | Differenzierungsmuster von Oberflächenmolekülen auf Zellen (<i>cluster of differentiation</i>) |
| cDNA | copy-Desoxyribonukleinsäure, zu mRNA komplementäre DNA |
| C-Domäne | Konstante Domäne (des TCR, <i>constant domain</i>) |
| CFSE | Carboxyfluorescein-diamino-succinimidylester |
| CGS15943 | 5-Amino-9-chlor-2-(2-furyl)[1,2,4]-triazolo[1,5- <i>c</i>]-chinazolin |
| CGS21680 | 2-(4-((2-Carboxymethyl)phenyl)ethylamino)-5'-N-ethylcarboxamidoadenosin |
| CHA | Cyclohexyladenosin |
| CHO | Chinesische Hamster Ovarien (<i>chinese hamster ovary</i>) |
| Ci | Curie (1Ci = 3.7 x 10 ¹⁰ Bq = 37 GBq) |

| | |
|----------------------|---|
| COPD | Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>) |
| COX | Cyclooxygenase |
| CPA | N ⁶ -Cyclopentyladenosin |
| cpm | Gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>) |
| CREB | cAMP response element-binding protein |
| CSF | Koloniestimulierender Faktor (<i>colony stimulating factor</i>) |
| C _T -Wert | <i>Cycle threshold value</i> |
| CVT-6883 | 3-Ethyl-1-propyl-8-(1-(3-trifluormethylbenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazolo-4-yl)-3,7-dihydropurin-2,6-dion |
| CXCL- | C-X-C-Motivligand- (Gruppe der Chemokine) |
| Da | Dalton (1 Da = 1.6601 x 10 ⁻²⁷ kg) |
| DAG | Diacylglycerol |
| DARPP-32 | <i>Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein</i> mit einem Molekulargewicht von 32 kDa |
| DC | Dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>) |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>) |
| DPCPX | 1,3-Dipropyl-8-cyclopentyladenosin |
| dpm | Tatsächliche Zerfälle pro Minute (<i>decays per minute</i>) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EC | <i>Enzyme commission</i> , verantwortlich für die numerische Sortierung von Enzymen |
| EC ₅₀ | Halbmaximale Wirkkonzentration (<i>effective concentration</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EEG | Elektroenzephalogramm |
| EGTA | Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERK | <i>extracellular signal regulated protein kinase</i> |
| FACS | Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>) |
| FCS | Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FDA | <i>Food and drug administration</i> , Zulassungsbehörde der USA |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer |

| | |
|------------------|---|
| g | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| G418 | Genticinsulfat |
| GABA | γ -Aminobuttersäure (<i>γ aminobutyric acid</i>) |
| GAP | GTPase-aktivierendes Protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GF/B | Glasfaserfilter B |
| GF/C | Glasfaserfilter C |
| GIRK | <i>G-protein-activated inwardly rectifying K⁺-channels</i> |
| GM-CSF | Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G protein-coupled receptor</i>) |
| G-Phase | Lückenphase im Zellzyklus (<i>gap phase</i>) |
| G-Protein | Guaninnucleotid-bindendes Protein |
| GRK | G-Protein-gekoppelter Rezeptor-Kinase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GTP γ S | Guanosin-5'-(γ -thio)triphosphat |
| h | Human |
| h | Stunde |
| HA | Haemagglutinin |
| HEK-293 | Humane embryonische Nierenzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>) |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-methylcarboxamid |
| His | Histidin |
| HMC-1 | Humane Mastzelllinie (<i>human mast cells-1</i>) |
| IB-MECA | N ⁶ -(3-Iodbenzyl)-adenosin-5'-N-methylcarboxamid |
| IC ₅₀ | Halbmaximale Inhibitionskonzentration (<i>inhibitory concentration</i>) |
| IFN- | Interferon- |
| IL- | Interleukin- |
| IP ₃ | Inositoltrisphosphat |
| IPDX | 3-Isobutyl-8-pyrrolidinoxanthin |
| I.U. | Internationale Einheit (<i>international unit</i>) |
| K _D | Gleichgewichtsdissoziationskonstante |
| kg | Kilogramm |
| KHP | Krebs-HEPES-Puffer |
| K _i | Gleichgewichtsinhibitionskonstante |

| | |
|-------------|---|
| KO | Knockout, Ausschaltung eines Gens |
| KRH | Krebs-Ringer-HEPES |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| LSC | Flüssigszintillationszähler (<i>liquid scintillation counter</i>) |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinasen |
| M-CSF | Makrophagen-koloniestimulierender Faktor |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| min | Minute |
| mM | Millimolar, millimol/Liter |
| μM | Mikromolar, mikromol/Liter |
| M-Phase | Mitosephase im Zellzyklus |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| MRE2029-F20 | <i>N</i> -Benzo-1,3-dioxol-5-yl-2-(5-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> -purin-8-yl)-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrazolo-3-yl-oxy)acetamid |
| MRS-1754 | <i>N</i> -(4-Cyanophenyl)-2-(-4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1 <i>H</i> -purin-8-yl)-phenoxy)acetamid |
| MSX-2 | 3-((3-Hydroxypropyl)-8- <i>m</i> -methoxystyryl)-7-methyl-1-propargylxanthin |
| myc | Myelocytomatosis |
| n | Anzahl der durchgeführten Versuche |
| n.d. | nicht bestimmt (<i>not determined</i>) |
| NECA | N-Ethylcarboxamidoadenosin |
| NF-AT | Nukleärer Faktor AT |
| NF-κB | Nukleärer Faktor κB |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomolar, nanomol/Liter |
| OD | Optische Dichte |
| PAMPs | Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>) |
| PBL | Lymphozyten des peripheren Blutes (<i>peripheral blood lymphocytes</i>) |
| PBMC | Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>) |
| PBS | Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PC12-Zellen | Phäochromozytom-Zellen aus dem chromaffinen Gewebe des Nebennierenmarks der Ratte |

| | |
|--------------------------|---|
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PEI | Polyethylenimin |
| PHA | Phytohaemagglutinin |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| PRPP | Phosphoribosylpyrophosphat |
| PSB | Pharmaceutical Sciences Bonn |
| PSB-10 | (R)-8-Ethyl-4-methyl-2-(2,3,5-trichlorophenyl)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1- <i>i</i>]purin-5-on |
| [³ H]PSB-11 | [³ H]8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo-[1,2- <i>i</i>]purin-5-on |
| PSB-36 | 1-Butyl-8-(3-noradamantanyl)-3-(3-hydroxypropyl)xanthin |
| [³ H]PSB-298 | [³ H]8-(4-(2-(2-Hydroxyethylamino)-2-oxo-ethoxy)-phenyl)-1-propylxanthin |
| [³ H]PSB-603 | [³ H]8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)-piperazin-1-sulfonyl)-phenyl)-1-propylxanthin |
| PSB-1115 | 1-Propyl-8-(4-sulfophenyl)xanthin |
| r | Ratten |
| Regadenoson | CVT3146, Lexiscan TM , 2-[4-[(Methylamino)carbonyl]-1H-pyrazol-1-yl]adenosin |
| R-PIA | (R)-N ⁶ -Phenylisopropyladenosin |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>) |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion |
| s | Sekunde |
| SCH-420814 | 2-(Furan-2-yl)-7-(2-(4-(4-(2-methoxyethoxy)phenyl)piperazin-1-yl)ethyl)-7H-pyrazolo[4,3- <i>e</i>][1,2,4]triazolo[1,5- <i>c</i>]pyrimidin-5-amin, „Preladenant“ |
| SCH-58261 | 5-Amino-7-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3- <i>e</i>]-1,2,4-triazolo[1,5- <i>c</i>]pyrimidin |
| SCID | Schwere kombinierte Immundefizienz (<i>severe combined immunode-</i> |

| | |
|----------|---|
| | <i>ficiency)</i> |
| SD | Standardabweichung (<i>standard deviation</i>) |
| SEM | Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>) |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| S-Phase | Synthesephase im Zellzyklus |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>) |
| TGF | Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>) |
| Th | T-Helfer |
| Thd | Thymin |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF- | Tumornekrosefaktor- |
| TRAX | Translin-assoziiertes Protein-X |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Einheit (<i>unit</i>) |
| UDP | Uridindiphosphat |
| us | unselektiv |
| USP | Ubiquitin-spezifische Protease |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UV | Ultraviolett |
| V-Domäne | Variable Domäne (des TCR) |
| VLE | Endotoxin-arm (<i>very low endotoxin</i>) |
| vs. | gegen (<i>versus</i>) |
| ZM241385 | 4-[2-[[7-Amino-2-(furyl)1,2,4-triazolo[2,3-a]1,3,5triazin-5-yl]-amino]-ethyl]phenol |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

9 Literaturverzeichnis

- [1] Janeway, C.A.; Travers, P. *Immunobiology*, ISBN 0-8153-4101-6. Garland Science Publishing: New York, **2005**.
- [2] Hof, H.; Doerries, R.; (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie*, ISBN 3-13-125313-4. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2002**.
- [3] Larsen, G.L.; Henson, P.M. Mediators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **1983**, *1*, 335-359.
- [4] Köhler, W.; Eggers, H.J.; Fleischer, B.; Marre, R.; Pfister, H.; Pulverer, G. *Medizinische Mikrobiologie*. ISBN 3-437-41640. Urban und Fischer Verlag: München und Jena, **2001**.
- [5] Zinkernagel, R.M.; Doherty, P.C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **1974**, *248*, 701-702.
- [6] Hannet, I.; Erkeller-Yuksel, F.; Deney, V.; Lydyard, P.; De Bruyère, M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol. Today* **1992**, *13*, 215-218.
- [7] Lüllmann-Rauch, R. *Histologie, Verstehen-Lernen-Nachschlagen*. ISBN 3-1312-9242-3. Thieme Verlag: Stuttgart, **2003**.
- [8] Garcia, K.C.; Teyton, L.; Wilson, I.A. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 369-397.
- [9] Alegre, M.L.; Frauwirth, K.A.; Thompson, C.B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* **2001**, *1*, 220-228.
- [10] Reich, Z.; Boniface, J.J.; Lyons, D.S.; Borochoy, N.; Wachtel, E.J.; Davis, M.M. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* **1997**, *387*, 617-620.
- [11] Hedrick, S.M.; Cohen, D.I.; Nielsen, E.A.; Davis, M.M. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* **1984**, *308*, 149-153.
- [12] Brenner, M.B.; McLean, J.; Dialynas, D.P.; Strominger, J.L.; Smith, J.A.; Owen, F.L.; Seidman, J.G.; Ip, S.; Rosen, F.; Krangel, M.S. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* **1986**, *322*, 145-149.

- [13] Del Prete, G. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Intern. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 427-455.
- [14] Salgame, P.; Abrams, J.S.; Clayberger, C.; Goldstein, H.; Convit, J.; Modlin, R.L.; Bloom, B.R. Differing lymphokine profile of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* **1991**, *254*, 279-282.
- [15] Drury, A.N.; Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action on the mammalian heart. *J. Physiol.* **1929**, *68*, 213-237.
- [16] Fredholm, B.B.; Ijzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J. International Union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
- [17] Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*, ISBN 0-89004-227-6, Raven Press: New York, **1978**, 107-118.
- [18] van Calker, D.; Muller, M.; Hamprecht, B. Adenosine regulates via two different types of receptors the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **1979**, *33*, 999-1005.
- [19] Daly, J.W.; Butts-Lamb, P.; Padgett, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1983**, *3*, 69-80.
- [20] Zhou, Q.Y.; Li, C.; Olah, M.E.; Johnson, R.A.; Stiles, G.L.; Civelli, O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor. The A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 7432-7436.
- [21] Ariens, E.J. Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1954**, *99*, 32-49.
- [22] Heilbronn, E.; Knoblauch, B.H.A.; Müller, C.E. Uridine nucleotide receptors and their ligands: structural, physiological, and pathophysiological aspects, with special emphasis on the nervous system. *Neurochem. Res.* **1997**, *22*, 1041-1050.
- [23] King, B.F.; Townsend-Nicholson, A. Nucleotide and nucleoside receptors. *Tocris Reviews* **2003**, *23*, 1-12.
- [24] Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H.Q.; Wintmolders, C.; van den Wyngaert, I.; van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 8573-8578.
- [25] Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kuegelgen, I.; Müller, C.E. Evidence for the functional expression and pharmacological characteriza-

- tion of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955-964.
- [26] Brunschweiler, A.; Müller, C.E. P2 receptors activated by uracil nucleotides - an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 289-312.
- [27] Jacobson, K.A.; Kim, H.O.; Siddiqi, S.M.; Olah, M.E.; Stiles, G.L.; von Lubitz, D.K.J.E. The A₃ adenosine receptor: design of selective ligands and therapeutic prospects. *Drugs of the future* **1995**, *20*, 689-699.
- [28] Daly, J.W.; Padgett, W.L. Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N⁶-cycloalkyl derivatives at A₁ and A₂ adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1089-1093.
- [29] Peakman, M.C.; Hill, S.J. Adenosine A_{2B} receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *111*, 191-198.
- [30] Fredholm, B.B.; Irenius, E.; Kull, B.; Schulte, G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 443-448.
- [31] Livingston, M.; Heany, L.G.; Ennis, M. Adenosine, inflammation and asthma - a review. *Inflamm. Res.* **2004**, *53*, 171-178.
- [32] Deckert, J.; Nothen, M.M.; Bryant, S.P.; Ren, H.; Wolf, H.K.; Stiles, G.L.; Spurr, N.K.; Propping, P. Human adenosine A₁ receptor gene: systematic screening for DNA sequence variation and linkage mapping on chromosome 1q31-32.1 using a silent polymorphism in the coding region. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1995**, *214*, 614-621.
- [33] Atkinson, M.R.; Townsend-Nicholson, A.; Nicholl, J.K.; Sutherland, G.R.; Schofield, P.R. Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A₃ receptor (ADORA3) gene. *Neurosci. Res.* **1997**, *29*, 73-79.
- [34] Deckert, J.; Nothen, M.M.; Bryant, S.P.; Schuffenhauer, S.; Schofield, P.; Spurr, N.K.; Propping, P. Mapping of the human adenosine A_{2A} receptor gene: relationship to potential schizophrenia loci on chromosome 22q and exclusion from the CATCH 22 region. *Hum. Genet.* **1997**, *99*, 326-328.
- [35] Pierce, K.D.; Furlong, T.J.; Selbie, L.A.; Shine, J. Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2B} receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1992**, *187*, 86-93.
- [36] Kristiansen, K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* **2004**, *103*, 21-80.

- [37] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Le Trong, I.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
- [38] Rasmussen, S.G.F.; Choi, H.J.; Rosenbaum, D.M.; Kobilka, T.S.; Thian, F.S.; Edwards, P.C.; Burghammer, M.; Ratnala, V.R.P.; Sanishvili, R.; Fischetti, R.F.; Schertler, G.F.X.; Weis, W.I.; Kobilka, B.K. Crystal structure of the human β 2-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2007**, *450*, 383-388.
- [39] Warne, T.; Serrano-Vega, M.J.; Baker, J.G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P.C.; Henderson, R.; Leslie, A.G.W.; Tate, C.G.; Schertler, G.F.X. Structure of a β 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2008**, *454*, 486-492.
- [40] Jaakola, V.-P.; Griffith, M.T.; Hanson, M.A.; Cherezov, V.; Chien, E.Y.T.; Lane, J.R.; Ijzerman, A.P.; St. Hilaire, C. The 2.6 Angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, *322*, 1211-1217.
- [41] Olah, M.E. Identification of A_{2A} adenosine receptor domains involved in selective coupling to G_s . Analysis of chimeric A_1/A_{2A} adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 337-344.
- [42] Wess, J. G-protein coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* **1997**, *11*, 346-354.
- [43] Bessis, A.S.; Bertrand, H.O.; Galvez, T.; de Colle, C.; Pin, J.P.; Acher, F. Three-dimensional model of the extracellular domain of the type 4a metabotropic glutamate receptor: new insights into the activation process. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 2200-2209.
- [44] Massotte, D.; Kieffer, B. Structure-function relationship in G protein-coupled receptors. In: *The G protein-coupled receptors handbook*, ISBN 978-1-58829-365-7, Humana Press: New York, **2005**, 3-32.
- [45] Hwangpo, T.N.; Iyengar, R. Heterotrimeric G proteins and their effector pathways. In: *The G protein-coupled receptors handbook*, ISBN 978-1-58829-365-7, Humana Press: New York, **2005**, 109-134.
- [46] Rogel, A.; Bromberg, Y.; Sperling, O.; Zoref-Shani, E. Phospholipase C is involved in the adenosine-mediated signal transduction pathway conferring protection against iodoacetic acid-induced injury in primary rat neuronal cultures. *Neurosci. Lett.* **2005**, *373*, 218-221.
- [47] Schulte, G.; Fredholm, B.B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* **2003**, *15*, 813-827.
- [48] Svenningsson, P.; Lindskog, M.; Rognoni, F.; Fredholm, B.B.; Greengard, P.; Fisone, G. Activation of adenosine A_{2A} and dopamine D_1 receptors stimulates

cyclic AMP-dependent phosphorylation of DARPP-32 in distinct populations of striatal projection neurons. *Neuroscience* **1998**, *84*, 223-228.

- [49] Kull, B.; Ferré, S.; Arslan, G.; Svenningsson, P.; Fuxe, K.; Owman, C.; Fredholm, B.B. Reciprocal interactions between adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors in chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1035-1045.
- [50] Lindskog, M.; Svenningsson, P.; Pozzi, L.; Kim, Y.; Flenberg, A.A.; Bibb, J.A.; Fredholm, B.B.; Nairn, A.C.; Greengard, P.; Fisone, G. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature* **2002**, *418*, 774-778.
- [51] Gubitz, A.K.; Widdowson, L.; Kurokawa, M.; Kirkpatrick, K.A.; Richardson, P.J. Dual signalling by the adenosine A_{2A} receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J. Neurochem.* **1996**, *67*, 374-381.
- [52] Stella, S.L.Jr.; Bryson, E.J.; Thoreson, W.B. A_{2A} adenosine receptors inhibit calcium influx through L-type calcium channels in rod photoreceptors of the salamander retina. *J. Neurophysiol.* **2002**, *87*, 351-360.
- [53] Baraldi, P.G.; Tabrizi, M.A.; Gessi, S.; Borea, P.A. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 238-263.
- [54] Fuxe, K.; Ferré, S.; Canals, M.; Torvinen, M.; Terasmaa, A.; Marcellino, D.; Goldberg, S.R.; Staines, W.; Jacobsen, K.X.; Lluís, C.; Woods, A.S.; Agnati, L.; Franco, R. Adenosine A_{2A} and dopamine D₂ heteromeric receptor complexes and their function. *J. Mol. Neurosci.* **2005**, *26*, 209-219.
- [55] Sun, C.N.; Cheng, H.C.; Chou, J.I.; Lee, S.Y.; Lin, Y.W.; Lai, H.L.; Chen, H.M.; Chern, Y. Rescue of p53 blockage by the A_{2A} adenosine receptor via a novel interacting protein, translin-associated protein X. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 454-466.
- [56] Milojevic, T.; Reiterer, V.; Stefan, E.; Korkhov, V.M.; Dorostkar, M.M.; Ducza, E.; Ogris, E.; Boehm, S.; Freissmuth, M.; Nanoff, C. The ubiquitin-specific protease Usp4 regulates the cell surface level of the A_{2A} receptor. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 1083-1094.
- [57] Gsandtner, I.; Charalambous, C.; Stefan, E.; Ogris, E.; Freissmuth, M.; Zetzula, J. Heterotrimeric G protein-independent signaling of a G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31898-31905.
- [58] Burgueno, J.; Blake, D.J.; Benson, M.A.; Tinsley, C.L.; Esapa, C.T.; Canela, E.I.; Penela, P.; Mallol, J.; Mayor, F.Jr.; Lluís, C.; Franco, R.; Ciruela, F. The adenosine A_{2A} receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37545-37552.

- [59] Gsandtner, I.; Freissmuth, M. A tail of two signals: The C terminus of the A_{2A}-adenosine receptor recruits alternative signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 447-449.
- [60] Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49*, 381-402.
- [61] Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J. Clin. Invest.* **2008**, *96*, 1979-1986.
- [62] Linden, J.; Thai, T.; Figler, H.; Jin, X.; Robeva, A.S. Characterization of human A_{2B} adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G_q in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 705-713.
- [63] Cooper, J.; Hill, S.J.; Alexander, S.P.H. An endogenous A_{2B} adenosine receptor coupled to cyclic AMP generation in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 546-550.
- [64] Mirabet, M.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Calcium mobilization in Jurkat T cells via A_{2B} adenosine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 1075-1082.
- [65] Palmer, T.M.; Gettys, T.W.; Stiles, G.L. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by rat A₃ adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16895-16902.
- [66] Ramkumar, V.; Stiles, G.L.; Beaven, M.A.; Ali, H. The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16887-16890.
- [67] Abbracchio, M.P.; Brambilla, R.; Ceruti, S.; Kim, H.O.; von Lubitz, D.K.J.E.; Jacobson, K.A.; Cattabeni, F. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A₃ receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 1038-1045.
- [68] Schulte, G.; Fredholm, B.B. Human adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors expressed in chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 477-482.
- [69] Schulte, G. Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege. *BIOspektrum* **2004**, *10*, 159-161.
- [70] Linden, J. Cloned adenosine A₃ receptors: pharmacological properties, species differences and receptors functions. *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, *15*, 298-306.
- [71] Daly, J.W. Adenosine receptors: target for future drugs. *J. Med. Chem.* **1982**, *3*, 197-207.

- [72] Müller, C.E.; Stein, B. Adenosine receptor antagonists: structure and potential therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* **1996**, *2*, 501-530.
- [73] Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413-492.
- [74] Müller, C.E. Adenosine receptor ligands - recent developments. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1269-1288.
- [75] Klotz, K.N. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 382-391.
- [76] Marx, D.; Ezeamuzie, C.I.; Nieber, K.; Szelenyi, I. Therapy of bronchial asthma with adenosine receptor agonists or antagonists. *Drug News Perspect.* **2001**, *14*, 89-100.
- [77] Hess, S. Recent advances in adenosine receptor antagonist research. *Expert Opin. Ther. Patents* **2001**, *11*, 1-29.
- [78] Jacobson, K.A.; Gao, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 247-264.
- [79] Nakata, H.; Yoshioka, K.; Kamiya, T. Purinergic-receptor oligomerization: implications for neural functions in the central nervous system. *Neurotox. Res.* **2004**, *6*, 291-297.
- [80] Carriba, P.; Ortiz, O.; Patkar, K.; Justinova, Z.; Stroik, J.; Themann, A.; Müller, C.E.; Woods, A.S.; Hope, B.T.; Ciruela, F.; Casadó, V.; Canela, E.I.; Lluís, C.; Goldberg, S.R.; Moratalla, R.; Franco, R.; Ferré, S. Striatal adenosine A_{2A} and cannabinoid CB₁ receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 2249-2259.
- [81] Ferré, S.; van Euler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B.B.; Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine A_{2A} receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 7238-7241.
- [82] Buhr, C.; Gössl, M.; Erbel, R.; Eggebrecht, H. Regadenoson in the detection of coronary artery disease. *Vasc. Health Risk Manag.* **2008**, *4*, 337-340.
- [83] Leaker, B.R.; O'Connor, B.; Hansel, T.T.; Barnes, P.J.; Meng, L.; Mathur, V.S.; Lieu, H.D. Safety of regadenoson, an adenosine A_{2A} receptor agonist for myocardial perfusion imaging, in mild asthma and moderate asthma patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Nucl. Cardiol.* **2008**, *15*, 329-336.
- [84] Feoktistov, I.; Polosa, R.; Holgate, S.T.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors: a novel therapeutic target in asthma? *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, *19*, 148-153.

- [85] Sitkovsky, M.V. Use of the A_{2A} adenosine receptor as a physiological immuno-suppressor and to engineer inflammation *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *64*, 493-501.
- [86] Zetterstrom, T.; Vernet, L.; Ungerstedt, U.; Tossman, U.; Jonzon, B.; Fredholm, B.B. Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. *Neurosci. Lett.* **1982**, *29*, 111-115.
- [87] Decking, U.K.; Schlieper, G.; Kroll, K.; Schrader, J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ. Res.* **1997**, *81*, 154-164.
- [88] Pastor-Anglada, M.; Casado, F.J.; Valdes, R.; Mata, J.; Garcia-Manteiga, J.; Molina, M. Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol. Membr. Biol.* **2001**, *18*, 81-85.
- [89] Synnestvedt, K.; Furuta, G.T.; Comerford, K.M.; Louis, N.; Karhausen, J.; Eltzschig, H.K.; Hansen, K.R.; Thompson, L.F.; Colgan, S.P. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 993-1002.
- [90] Pouliot, M.; Fiset, M.E.; Masse, M.; Naccache, P.H.; Borgeat, P. Adenosine up-regulates cyclooxygenase-2 in human granulocytes: impact on the balance of eicosanoid generation. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 5279-5286.
- [91] Cadieux, J.S.; Leclerc, P.; St-Onge, M.; Dussault, A.A.; Laflamme, C.; Picard, S.; Ledent, C.; Borgeat, P.; Pouliot, M. Potentiation of neutrophil cyclooxygenase-2 by adenosine: an early anti-inflammatory signal. *J. Cell. Sci.* **2005**, *118*, 1437-1447.
- [92] Koshiba, M.; Rosin, D.L.; Hayashi, N.; Linden, J.; Sitkovsky, M.V. Patterns of A_{2A} extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A_{2A} receptor monoclonal antibodies. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 614-624.
- [93] Sitkovsky, M.V.; Ohta, A. The 'danger' sensors that stop the immune response: the A₂ adenosine receptors? *Trends Immunol.* **2005**, *26*, 299-304.
- [94] Bourne, H.R.; Lichtenstein, L.M.; Melmon, K.L.; Henney, C.S.; Weinstein, Y.; Shearer, G.M. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* **1974**, *184*, 19-28.
- [95] Thiel, M.; Caldwell, C.C.; Sitkovsky, M.V. The critical role of adenosine A_{2A} receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes. Infect.* **2003**, *5*, 515-526.
- [96] Abbracchio, M.P.; Ceruti, S. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal.* **2007**, *3*, 13-25.

- [97] Ohta, A.; Sitkovsky, M.V. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **2001**, *414*, 916-920.
- [98] Akkari, R.; Burbiel, J.C.; Hockemeyer, J.; Müller, C.E. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1375-1399.
- [99] Sajjadi, F.G.; Takabayashi, K.; Foster, A.C.; Domingo, R.C.; Firestein, G.S. Inhibition of TNF- α expression by adenosine: role of A₃ adenosine receptors. *J. Immunol.* **1996**, *156*, 3435-3442.
- [100] Haskó, G.; Kuhel, D.G.; Chen, J.F.; Schwarzschild, M.A.; Deitch, E.A.; Mabley, J.G.; Marton, A.; Szabo, C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2A} receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* **2000**, *14*, 2065-2074.
- [101] Link, A.A.; Kino, T.; Worth, J.A.; McGuire, J.L.; Crane, M.L.; Chrousos, G.P.; Wilder, R.L.; Elenkov, I.J. Ligand-activation of the adenosine A_{2A} receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 436-442.
- [102] Németh, Z.H.; Lutz, C.S.; Csóka, B.; Deitch, E.A.; Leibovich, S.J.; Gause, W.C.; Tone, M.; Pacher, P.; Vizi, E.S.; Haskó, G. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A_{2B} receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 8260-8270.
- [103] Fredholm, B.B.; Cunha, R.A.; Svenningsson, P. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors and therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *3*, 413-426.
- [104] Khoa, N.D.; Montesinos, M.C.; Williams, A.J.; Kelly, M.; Cronstein, B.N. Th1 cytokines regulate adenosine receptors and their downstream signaling elements in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 3991-3998.
- [105] Xaus, J.; Mirabet, M.; Lloberas, J.; Soler, C.; Lluís, C.; Franco, R.; Celada, A. IFN- γ upregulates the A_{2B} adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 3607-3614.
- [106] Murphree, L.J.; Sullivan, G.W.; Marshall, M.A.; Linden, J. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF- κ B in A_{2A} adenosine receptor induction. *Biochem. J.* **2005**, *391*, 575-580.
- [107] Panther, E.; Idzko, M.; Herouy, Y.; Rheinen, H.; Gebicke-Haerter, P.J.; Mrowietz, U.; Dichmann, S.; Norgauer, J. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1963-1970.
- [108] Panther, E.; Corinti, S.; Idzko, M.; Herouy, Y.; Napp, M.; la Sala, A.; Girolomoni, G.; Norgauer, J. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* **2003**, *101*, 3985-3990.

- [109] Rose, F.R.; Hirschhorn, R.; Weissmann, G.; Cronstein, B.N. Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J. Exp. Med.* **1988**, *167*, 1186-1194.
- [110] Cronstein, B.N.; Levin, R.I.; Philips, M.; Hirschhorn, R.; Abramson, S.B.; Weissmann, G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A₁ receptors and inhibited via A_{2A} adenosine receptors. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 2201-2206.
- [111] Haskó, G.; Cronstein, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 33-39.
- [112] Cronstein, B.N.; Levin, R.I.; Belanoff, J.; Weissmann, G.; Hirschhorn, R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **1986**, *78*, 760-770.
- [113] Thiel, M.; Chambers, J.D.; Choukèr, A.; Fischer, S.; Zourelidis, C.; Bardenheuer, H.J.; Arfors, K.E.; Peter, K. Effect of adenosine on the expression of $\beta(2)$ -integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **1996**, *59*, 671-682.
- [114] Cronstein, B.N.; Rosenstein, E.D.; Kramer, S.B.; Weissmann, G.; Hirschhorn, R. Adenosine; a physiologic modulator of of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A₂ receptor on human neutrophils. *J. Immunol.* **1985**, *135*, 1366-1371.
- [115] Cronstein, B.N.; Kramer, S.B.; Weissmann, G.; Hirschhorn, R. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J. Exp. Med.* **1983**, *158*, 1160-1177.
- [116] Thiel, M.; Choukèr, A. Acting via A₂ receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor- α of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **1995**, *126*, 275-282.
- [117] Richter, J. Effect of adenosine analogues and cAMP-raising agents on TNF-, GM-CSF-, and chemotactic peptide-induced degranulation in single adherent neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **1992**, *51*, 270-275.
- [118] Ramkumar, V.; Stiles, G.L.; Beaven, M.A.; Ali, H. The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16887-16890.
- [119] Hannon, J.P.; Pfannkuche, H.J.; Fozard, J.R. A role for mast cells in adenosine A₃ receptor-mediated hypotension in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *115*, 945-952.
- [120] Blackburn, M.R.; Volmer, J.B.; Thrasher, J.L.; Zhong, H.; Crosby, J.R.; Lee, J.J.; Kellems, R.E. Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 159-170.

- [121] Ryzhov, S.; Goldstein, A.E.; Matafonov, A.; Zeng, D.; Biaggioni, I.; Feoktistov, I. Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A_{2B}-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 7726-7733.
- [122] Bonnafous, J.C.; Dornand, J.; Favero, J.; Mani, J.C. Lymphocyte membrane adenosine receptors coupled to adenylate cyclase - properties and occurrence in various lymphocyte subclasses. *J. Recept. Res.* **1981**, *2*, 347-366.
- [123] Holte, H.; Torjesen, P.; Blomhoff, H.K.; Ruud, E.; Funderud, S.; Smeland, E.B. Cyclic AMP has the ability to influence multiple events during B cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* **1988**, *18*, 1359-1366.
- [124] Sitkovsky, M.V.; Lukashev, D.; Apasov, S.; Kojima, H.; Koshiba, M.; Caldwell, C.; Ohta, A.; Thiel, M. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A_{2A} receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 657-682.
- [125] Koshiba, M.; Kojima, H.; Huang, S.; Apasov, S.; Sitkovsky, M.V. Memory of extracellular adenosine A_{2A} purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25881-25889.
- [126] Lappas, C.M.; Rieger, J.M.; Linden, J. A_{2A} adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 1073-1080.
- [127] Huang, S.; Apasov, S.; Koshiba, M.; Sitkovsky, M.V. Role of A_{2A} extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* **1997**, *90*, 1600-1610.
- [128] Hoskin, D.W.; Butler, J.J.; Drapeau, D.; Haeryfar, S.M.M.; Blay, J. Adenosine acts through an A₃ receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells. *Int. J. Cancer* **2002**, *99*, 386-395.
- [129] Apasov, S.; Chen, J.F.; Smith, P.; Schwarzschild, M.A.; Fink, J.S.; Sitkovsky, M.V. Study of A_{2A} adenosine receptor gene deficient mice reveals that adenosine analogue CGS 21680 possesses no A_{2A} receptor-unrelated lymphotoxicity. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *131*, 43-50.
- [130] Apasov, S.; Chen, J.F.; Smith, P.; Sitkovsky, M.V. A_{2A} receptor dependent and A_{2A} receptor independent effects of extracellular adenosine on murine thymocytes in conditions of adenosine deaminase deficiency. *Blood* **2000**, *95*, 3859-3867.
- [131] Lappas, C.M.; Sullivan, G.W.; Linden, J. Adenosine A_{2A} agonists in development for the treatment of inflammation. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14*, 797-806.
- [132] Ohta, A.; Gorelik, E.; Prasad, S.J.; Ronchese, F.; Lukashev, D.; Wong, M.K.K.; Huang, X.; Caldwell, S.; Liu, K.; Smith, P.; Chen, J.F.; Jackson, E.K.; Apasov,

- S.; Abrams, J.S.; Sitkovsky, M.V. A_{2A} adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 13132-13137.
- [133] Spicuzza, L.; Di Maria, G.; Polosa, R. Adenosine in the airways: Implications and applications. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *533*, 77-88.
- [134] Yang, D.; Zhang, Y.; Nguyen, H.G.; Koupenova, M.; Chauhan, A.K.; Makitalo, M.; Jones, M.R.; St. Hilaire, C.; Seldin, D.C.; Toselli, P.; Lamperti, E.; Schreiber, B.M.; Gavras, H.; Wagner, D.D.; Ravid, K. The A_{2B} adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1913-1923.
- [135] Mohsenin, A.; Blackburn, M.R. Adenosine signaling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2008**, *12*, 54-59.
- [136] Ryzhov, S.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A.E.; Novitskiy, S.V.; Blackburn, M.R.; Biaggioni, I.; Feoktistov, I. Effect of A_{2B} adenosine receptor gene ablation on adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 694-700.
- [137] Kreckler, L.M.; Wan, T.C.; Ge, Z.D.; Auchampach, J.A. Adenosine inhibits tumor necrosis factor- α release from mouse peritoneal macrophages via A_{2A} and A_{2B} but not the A₃ adenosine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 172-180.
- [138] Gomez, G.; Sitkovsky, M.V. Differential requirement for A_{2A} and A₃ adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood* **2003**, *102*, 4472-4478.
- [139] Sun, C.X.; Zhong, H.; Mohsenin, A.; Morschl, E.; Chunn, J.L.; Molina, J.G.; Belardinelli, L.; Zeng, D.; Blackburn, M.R. Role of A_{2B} adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2173-2182.
- [140] Mustafa, S.J.; Nadeem, A.; Fan, M.; Zhong, H.; Belardinelli, L.; Zeng, D. Effect of a specific and selective A_{2B} adenosine receptor antagonist on adenosine agonist AMP and allergen-induced airway responsiveness and cellular influx in a mouse model of asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 1246-1251.
- [141] Zhong, H.; Wu, Y.; Belardinelli, L.; Zeng, D. A_{2B} adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF- α release. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2006**, *35*, 587-592.
- [142] Rosi, S.; McGann, K.; Hauss-Wegrzyniak, B.; Wenk, G.L. The influence of brain inflammation upon neuronal adenosine A_{2B} receptors. *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 220-227.
- [143] Bilkei-Gorzo, A.; Abo-Salem, O.M.; Hayallah, A.M.; Michel, K.; Müller, C.E.; Zimmer, A. Adenosine receptor subtype-selective antagonists in inflammation and hyperalgesia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2008**, *377*, 65-76.

- [144] Kolachala, V.; Asamoah, V.; Wang, L.; Obertone, T.S.; Ziegler, T.R.; Merlin, D.; Sitaramann, S.V. TNF- α upregulates adenosine 2B (A_{2B}) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A_{2B}R overexpression in colitis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2647-2657.
- [145] Sullivan, G.W. Adenosine A_{2A} receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4*, 1313-1319.
- [146] Montesinos, M.C.; Desai, A.; Chen, J.F.; Yee, H.; Schwarzschild, M.A.; Fink, J.S.; Cronstein, B.N. Adenosine A_{2A} and A₃ receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Am. J. Path.* **2003**, *160*, 2009-2018.
- [147] Di Virgilio, F.; Mutini, C.; Chiozzi, P.; Falzoni, S.; Di Susino, M.; Sanz, J.M.; Ferrari, D. A purinergic hypothesis for immunomodulation. *Ital. J. Biochem.* **1996**, *45*, 195-203.
- [148] Cronstein, B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* **1994**, *76*, 5-13.
- [149] Spychala, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 161-173.
- [150] Gillis, S.; Watson, J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules - V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med.* **1980**, *152*, 1709-1719.
- [151] Schumacher, B.; Scholle, S.; Hölzl, J.; Khudeir, N.; Hess, S.; Müller, C.E. Lignans isolated from valerian: identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A₁ adenosine receptors. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1479-1485.
- [152] Apasov, S.G.; Blackburn, M.R.; Kellems, R.E.; Smith, P.T.; Sitkovsky, M.V. Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 131-141.
- [153] Hoskin, D.W.; Mader, J.S.; Furlong, S.J.; Conrad, D.M.; Blay, J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor. *Int. J. Oncol.* **2008**, *32*, 535.
- [154] Wolberg, G.; Zimmerman, T.P.; Hiemstra, K.; Winston, M.; Chu, L.C. Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity: possible role of cyclic adenosine monophosphate. *Science* **1975**, *87*, 957-959.
- [155] Marone, G.; Plaut, M.; Lichtenstein, L.M. Characterization of a specific adenosine receptor on human lymphocytes. *J. Immunol.* **1978**, *121*, 2153-2159.
- [156] Marone, G.; Plaut, M.; Lichtenstein, L.M. The role of adenosine in the control of immune function. *Ric. Clin. Lab.* **1980**, *10*, 303-312.

- [157] Varani, K.; Gessi, S.; Dalpiaz, A.; Ongini, E.; Borea, P.A. Characterization of A_{2A} adenosine receptors in human lymphocyte membranes by [³H]-SCH 58261 binding. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 386-392.
- [158] Mirabet, M.; Herrera, C.; Cordero, O.J.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Expression of A_{2B} adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 491-502.
- [159] Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Cattabriga, E.; Avitabile, A.; Gavioli, R.; Fortini, C.; Leung, E.; MacLennan, S.; Borea, P.A. Expression of A₃ adenosine receptors in human lymphocytes: up-regulation in T cell activation. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 711-719.
- [160] Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Cattabriga, E.; Pancaldi, C.; Szabadkai, Y.; Rizzuto, R.; Klotz, K.N.; Leung, E.; MacLennan, S.; Baraldi, P.G.; Borea, P.A. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A_{2B} receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand [³H]MRE 2029-F20. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 2137-2147.
- [161] Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Ongini, E.; Borea, P.A. A_{2A} adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 2-11.
- [162] Yip, L.; Cheung, C.W.; Corriden, R.; Chen, Y.; Insel, P.A.; Junger, W.G. Hyper-tonic stress regulates T-cell function by the opposing actions of extracellular adenosine triphosphate and adenosine. *Shock* **2007**, *27*, 242-250.
- [163] Van der Ploeg, I.; Ahlberg, S.; Parkinson, F.E.; Olsson, R.A.; Fredholm, B.B. Functional characterization of adenosine A₂ receptors in Jurkat cells and PC12 cells using adenosine receptor agonists. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1996**, *353*, 250-260.
- [164] Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Morelli, A.; Ferrari, D.; Leung, E.; Baraldi, P.G.; Spalluto, G.; Borea, P.A. Pharmacological and biochemical characterization of A₃ adenosine receptors in Jurkat T cells. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 116-126.
- [165] Hayallah, A.M. Design, synthesis, biological investigation and structure activity relationship of new, potent A_{2B}-selective adenosine receptor antagonists as potential immunomodulators. Dissertation. *Universität Bonn*, **2003**.
- [166] Bertarelli, D.C.G. Charakterisierung der A_{2B} Adenosinrezeptoren nativer und rekombinanter Zelllinien durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. Diplom. *Universität Bonn*, **2003**,
- [167] Bertarelli, D.C.G. Adenosin-A_{2B} -und A_{2A}-Rezeptoren als antiinflammatorische Arzneistoff-Targets: Molekulare und funktionelle Charakterisierung, Klonierung und Evaluation neuer Liganden. Dissertation. *Universität Bonn*, **2007**.

- [168] Lander, E.S.; Linton, L.M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M.C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [169] Venter, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [170] Freeman, W.M.; Walker, S.J.; Vrana, K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* **1999**, *26*, 112-125.
- [171] Wilhelm, J.; Pingoud, A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* **2003**, *4*, 1120-1128.
- [172] Linden, J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1835-1837.
- [173] Wilkins, M.R.; Pasquali, C.; Appel, R.D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J.C.; Yan, J.X.; Gooley, A.; Hughes, G.; Humphrey-Smith, I.; Williams, K.L.; Hochstrasser, D.F. From proteins to proteoms: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (NY)* **1996**, *14*, 61-65.
- [174] Wilkins, M.R.; Sanchez, J.C.; Gooley, A.A.; Appel, R.D.; Humphrey-Smith, I.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1996**, *13*, 19-50.
- [175] Mijalski, T. Untersuchungen zur Genregulation anhand vergleichender Transkriptom-Proteomanalysen und Promotorstudien im Mausmodell. Dissertation. *Universität Braunschweig*, **2005**.
- [176] Müller, C.E. A₁ adenosine receptors and their ligands: Overview and recent developments. *Farmaco*. **2001**, *56*, 77-80.
- [177] Reith, U. Native und rekombinante humane Adenosinrezeptoren: Charakterisierung, Interaktion mit pflanzlichen Inhaltsstoffen und Suche nach neuen Leitstrukturen. Dissertation. *Universität Bonn*, **2001**.
- [178] Hinz, S. Bedeutung ausgewählter Aminosäuren für die Ligand-Bindung und Aktivierung des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors. Diplom. *Universität Bonn*, **2007**.
- [179] Diekmann, M. Charakterisierung neuer Radioliganden als pharmakologische Werkzeuge für A_{2B}- und A₃ Adenosinrezeptoren, Identifizierung neuer Leitstrukturen & Analyse von struktur-Wirkungs-Beziehungen durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. Dissertation. *Universität Bonn*, **2003**.

- [180] Ji, X.D.; Jacobson, K.A. Use of the triazolotriazine [^3H]ZM 241385 as a radioligand at recombinant human $\text{A}_{2\text{B}}$ adenosine receptors. *Drug Des. Disov.* **1999**, *16*, 217-226.
- [181] Drabczynska, A.; Müller, C.E.; Lacher, S.K.; Schumacher, B.; Karolak-Wojciechowska, J.; Nasal, A.; Kawczak, P.; Yuzlenko, O.; Pekala, E.; Kięc-Kononowicz, K. Synthesis and biological activity of tricyclic aryl-imidazo-, pyrimido-, and diazepinopurinediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7258-7281.
- [182] Neustadt, B.R.; Hao, J.; Lindo, N.; Greenlee, W.J.; Stamford, A.W.; Tulshian, D.; Ongini, E.; Hunter, J.; Monopoli, A.; Bertorelli, R.; Foster, C.; Arik, L.; Lachowicz, J.; Ng, K.; Feng, K.-I. Potent, selective, and orally active adenosine $\text{A}_{2\text{A}}$ receptor antagonists: arylpiperazine derivatives of pyrazolo[4,3-*e*]-1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1376-1380.
- [183] Ongini, E.; Dionisotti, S.; Gessi, S.; Irenius, E.; Fredholm, B.B. Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1999**, *359*, 7-10.
- [184] Dionisotti, S.; Ongini, E.; Zocchi, C.; Kull, B.; Arslan, G.; Fredholm, B.B. Characterization of human $\text{A}_{2\text{A}}$ adenosine receptors with the antagonist radioligand [^3H]-SCH58261. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *121*, 353-360.
- [185] Hayallah, A.M.; Sandoval-Ramirez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, B.; Schumacher, B.; Daly, J.W.; Müller, C.E. 1,8-Disubstituted xanthine derivatives: synthesis of potent $\text{A}_{2\text{B}}$ -selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1500-1510.
- [186] Schumacher, B. Identifizierung, Struktur-Wirkungsbeziehungen und Aktivitätsprofile neuer Adenosinrezeptor-Liganden. Dissertation. *Universität Bonn*, **2002**.
- [187] Klotz, K.N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B.B.; Lohse, M.J. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 1-9.
- [188] Uustare, A.; Vonk, A.; Terasmaa, A.; Fuxe, K.; Rinken, A. Kinetic and functional properties of [^3H]ZM241385, a high affinity antagonist for adenosine $\text{A}_{2\text{A}}$ receptors. *Life Sci.* **2005**, *76*, 1513-1526.
- [189] Bertarelli, D.C.G.; Diekmann, M.; Hayallah, A.M.; Rüsing, D.; Iqbal, J.; Preiss, B.; Verspohl, E.J.; Müller, C.E. Characterization of human and rodent native and recombinant adenosine $\text{A}_{2\text{B}}$ receptors by radioligand binding studies. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 559-571.
- [190] Müller, C.E.; Diekmann, M.; Thorand, M.; Ozola, V. [^3H]8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl-(8*R*)-4,5,7,8-tetrahydro-1*H*-imidazo[2,1-*i*]-purin-5-one ([^3H]PSB-11), a novel high-affinity antagonist radioligand for human A_3 adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 501-503.

- [191] George, S.R.; O'Dowd, B.F.; Lee, S.P. G protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 808-820.
- [192] Heldin, C.H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **1995**, *80*, 213-223.
- [193] Angers, S.; Salahpour, A.; Bouvier, M. Dimerization: An emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 409-435.
- [194] Canals, M.; Burgueno, J.; Marcellino, D.; Cabello, N.; Canela, E.I.; Mallol, J.; Agnati, L.; Ferré, S.; Bouvier, M.; Fuxe, K.; Ciruela, F.; Lluís, C.; Franco, R. Homodimerization of adenosine A_{2A} receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 726-734.
- [195] Franco, R.; Casadó, V.; Cortés, A.; Mallol, J.; Ciruela, F.; Ferré, S.; Lluís, C.; Canela, E.I. G protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, S90-S98.
- [196] Conde, S.V.; Gonzalez, C.; Batuca, J.R.; Monteiro, E.C.; Obeso, A. An antagonistic interaction between A_{2B} adenosine and D₂ dopamine receptors modulates the function of rat carotid body chemoreceptor cells. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 1369-1381.
- [197] Terrillon, S.; Bouvier, M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 30-34.
- [198] Jordan, B.A.; Devi, L.A. G protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **1999**, *399*, 697-700.
- [199] Ferré, S.; Ciruela, F.; Borycz, J.; Solinas, M.; Quarta, D.; Antoniou, K.; Quiroz, C.; Justinova, Z.; Lluís, C.; Franco, R.; Goldberg, S.R. Adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 2391-2399.
- [200] Yoshioka, K.; Saitoh, O.; Nakata, H. Heteromeric association creates a P2Y₁-like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 7617-7622.
- [201] Yoshioka, K.; Saitoh, O.; Nakata, H. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 7617-7622.
- [202] Fuxe, K.; Ferré, S.; Canals, M.; Torvinen, M.; Terasmaa, A.; Marcellino, D.; Goldberg, S.R.; Staines, W.; Jacobsen, K.X.; Lluís, C.; Woods, A.S.; Agnati, L.; Franco, R. Adenosine A_{2A} and dopamine D₂ heteromeric receptor complexes and their function. *J. Mol. Neurosci.* **2005**, *26*, 209-219.

- [203] Sitkovsky, M.V. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression and tissue protection. *Purinergic Signal.* **2008**, 4, Supplement 5, S8.
- [204] Pacheco, R.; Ciruela, F.; Casadó, V.; Mallol, J.; Gallart, T.; Lluís, C.; Franco, R. Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 33352-33358.
- [205] Hesselgesser, J.; Liang, M.; Hoxie, J.; Greenberg, M.; Brass, L.F.; Orsini, M.J.; Taub, D.; Horuk, R. Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. *J. Immunol.* **1998**, 160, 877-883.
- [206] Oiry, C.; Gagne, D.; Cottin, E.; Bernad, N.; Galleyrand, J.C.; Bergé, G.; Lignon, M.F.; Eldin, P.; Le Cunff, M.; Léger, J.; Clerc, P.; Fourmy, D.; Martinez, J. CholecystokininB receptor from human Jurkat lymphoblastic T cells is involved in activator protein-1-responsive gene activation. *Mol. Pharmacol.* **1997**, 52, 292-299.
- [207] Burgueno, J.; Blake, D.J.; Benson, M.A.; Tinsley, C.L.; Esapa, C.T.; Canela, E.I.; Penela, P.; Mallol, J.; Mayor Jr, F.; Lluís, C.; Franco, R.; Ciruela, F. The adenosine A_{2A} receptor interacts with the actin-binding protein α -actinin. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 37545-37552.
- [208] Ohkubo, S.; Nakanishi, H.; Kimura, J.; Matsuoka, I. Effects of AMP derivatives on cyclic AMP levels in NG108-15 cells. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, 129, 1244-1250.
- [209] Albasanz, J.L.; Rodríguez, A.; Ferrer, I.; Martín, M. Adenosine A_{2A} receptors are upregulated in Pick's disease frontal cortex. *Brain Pathol.* **2006**, 16, 249-255.
- [210] Eckle, T.; Krahn, T.; Grenz, A.; Koehler, D.; Mittelbronn, M.; Ledent, C.; Jacobson, M.A.; Osswald, H.; Thompson, L.F.; Unertl, K.; Eltzschig, H.K. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A_{2B} adenosine receptors. *Circulation* **2007**, 115, 1581-1590.
- [211] Teng, B.; Ledent, C.; Mustafa, S.J. Up-regulation of A_{2B} adenosine receptor in A_{2A} adenosine receptor knockout mouse coronary artery. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2008**, 44, 905-914.
- [212] Eltzschig, H.K.; Ibla, J.C.; Furuta, G.T.; Leonard, M.O.; Jacobson, K.A.; Enjyoji, K.; Robson, S.C.; Colgan, S.P. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A_{2B} receptors. *J. Exp. Med.* **2003**, 198, 783-796.
- [213] Grenz, A.; Osswald, H.; Eckle, T.; Yang, D.; Zhang, H.; Tran, Z.V.; Klingel, K.; Ravid, K.; Eltzschig, H.K. The reno-vascular A_{2B} adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS Med.* **2008**, 5, 0968-0986.
- [214] Feoktistov, I.; Ryzhov, S.; Zhong, H.; Goldstein, A.E.; Matafonov, A.; Zeng, D.; Biaggioni, I. Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and

- smooth muscle cells toward an A_{2B} angiogenic phenotype. *Hypertension* **2004**, *44*, 649-654.
- [215] Panjehpour, M.; Castro, M.; Klotz, K.N. Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A_{2B} adenosine receptors mediating a Ca²⁺ signal. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 211-218.
- [216] Phelps, P.T.; Anthes, J.C.; Correll, C.C. Characterization of adenosine receptors in the human bladder carcinoma T24 cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *536*, 28-37.
- [217] Li, S.; Huang, S.; Peng, S.B. Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: Involvement in tumor progression. *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 1329-1339.
- [218] Novitskiy, S.V.; Ryzhov, S.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A.E.; Huang, Y.; Tikhomirov, O.Y.; Blackburn, M.R.; Biaggioni, I.; Carbone, D.P.; Feoktistov, I.; Dikov, M.M. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* **2008**, *112*, 1822-1831.
- [219] Fortin, A.; Harbour, D.; Fernandes, M.; Borgeat, P.; Bourgoin, S. Differential expression of adenosine receptors in human neutrophils: upregulation by specific Th1 cytokines and lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *79*, 574-585.
- [220] Zhong, H.; Belardinelli, L.; Maa, T.; Zeng, D. Synergy between A_{2B} adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2005**, *32*, 2-8.
- [221] Rollins, B.M.; Burn, M.; Coakley, R.D.; Chambers, L.A.; Hirsh, A.J.; Clunes, M.T.; Lethem, M.I.; Donaldson, S.H.; Tarran, R. A_{2B} adenosine receptors regulate the mucus clearance component of the lung's innate defense system. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2008**, *39*, 190-197.
- [222] Kolachala, V.L.; Bajaj, R.; Chalasani, M.; Sitaraman, S.V. Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *294*, 401-410.
- [223] Brackett, L.E.; Daly, J.W. Functional characterization of the A_{2B} adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 801-814.
- [224] Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Cattabriga, E.; Benini, A.; Klotz, K.N.; Baraldi, P.G.; Tabrizi, M.A.; MacLennan, S.; Leung, E.; Borea, P.A. Pharmacological characterization of novel adenosine ligands in recombinant and native human A_{2B} receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1601-1612.
- [225] Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Pharmacological characterization of adenosine A_{2B} receptors - studies in human mast cells co-expressing A_{2A} and A_{2B} adenosine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 627-633.

- [226] Gygi, S.P.; Rochon, Y.; Franza, B.R.; Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1720-1730.
- [227] Klaasse, E.C.; Ijzerman, A.P.; de Grip, W.J.; Beukers, M.W. Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal.* **2008**, *4*, 21-37.
- [228] Vendite, D.; Sanz, J.M.; Lopez-Alanon, D.M.; Vacas, J.; Andres, A.; Ros, M. Desensitization of A₁R-mediated inhibition of adenylyl cyclase in cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* **1998**, *23*, 211-218.
- [229] Blumenstein, Y.; Maximyuk, O.P.; Lozovaya, N.; Yatsenko, N.M.; Kanevsky, N.; Krishtal, O.; Dascal, N. Intracellular Na⁺ inhibits voltage-dependent N-type Ca²⁺ channels by a G-protein $\beta\gamma$ -subunit-dependent mechanism. *J. Physiol.* **2004**, *556*, 121-134.
- [230] Guse, A.H. Regulation of calcium signalling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 239-248.
- [231] Johnson, J.D.; Misler, S. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signalling in human beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14566-14571.
- [232] Herlitze, S.; Garcia, D.E.; Mackie, K.; Hille, B.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* **1996**, *380*, 258-262.
- [233] Dickenson, J.M.; Hill, S.J. Involvement of G-protein $\beta\gamma$ -subunits in coupling the adenosine A₁ receptor to phospholipase C in transfected CHO cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *355*, 85-93.
- [234] Englert, M.; Quitterer, U.; Klotz, K.N. Effector coupling of stably transfected human A₃ adenosine receptors in CHO cells. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 61-65.
- [235] Kaulich, M. P2Y₂-Rezeptoren und weitere pyrimidinerge P2Y-Rezeptorsubtypen: Funktionelle Charakterisierung, Klonierung und Suche nach selektiven Liganden. Dissertation. *Universität Bonn*, **2003**.
- [236] Wang, L.; Jacobsen, S.E.W.; Bengtsson, A.; Erlinge, D. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34⁺ stem and progenitor cells. *BMC Immunol.* **2004**, *5*.
- [237] Jin, J.; Dasari, V.R.; Sistare, F.D.; Kunapuli, S.P. Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 789-794.
- [238] Reed, J.C.; Alpers, J.D.; Nowell, P.C.; Hoover, R.G. Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 3982-3986.

- [239] Hovi, T.; Allison, A.C.; Allsop, J. Rapid increase of phosphoribosyl pyrophosphate concentration after mitogenic stimulation of lymphocytes. *FEBS Lett.* **1975**, *55*, 291.
- [240] Fox, I.; Kelley, W.N. Phosphoribosyl pyrophosphate in man: biochemical and clinical significance. *Ann. Intern. Med.* **1971**, *74*, 424.
- [241] Hovi, T.; Smyth, J.F.; Allison, A.C.; Williams, S.C. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **1976**, *23*, 395-403.
- [242] Hovi, T.; Allison, A.C.; Williams, S.S. Mitogen-induced T lymphocyte proliferation: a reappraisal of the early requirement of extracellular ionized calcium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1979**, *88*, 1337-1345.
- [243] Berridge, M.J.; Lipp, P.; Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *1*, 11-21.
- [244] Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Lipp, P. Calcium - a life and death signal. *Nature* **1998**, *395*, 645-648.
- [245] Vandenplas, M.L.; Mouton, W.L.; Vandenplas, S.; Bester, A.J.; Ricketts, M.H. Increased intracellular Ca^{2+} is necessary for maximal expression of the proto-oncogen c-jun in the Jurkat T-cell line. *Biochem. J.* **1990**, *267*, 349-351.
- [246] Crabtree, G.R. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* **1989**, *243*, 355-361.
- [247] Oksenberg, D.; Oksenberg, J.R.; Sakai, K.; Peroutka, S.J.; Steinman, L. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate metabolism in activated T-cell clones. *Immunology* **1989**, *67*, 484-488.
- [248] McIntire, O.R.; Ebaugh, F.C. The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P32 incorporation in the DNA, RNA and acid soluble fraction. *Blood* **1962**, *19*, 443-453.
- [249] Naspitz, C.K.; Richter, M. The action of phytohemagglutinin in vivo and in vitro, a review. *Progr. Allergy* **1968**, *12*, 1-85.
- [250] Winger, L.A.; Nowell, P.C.; Daniele, R.P. Sequential proliferation induced in human peripheral blood lymphocytes by mitogen. *J. Immunol.* **1977**, *118*, 1763-2428.
- [251] Van Stipdonk, M.J.; Lemmens, E.E.; Schoenberger, S.P. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 423-429.
- [252] Hungerford, D.A.; Donnelly, A.J.; Nowell, P.C.; Beck, S. The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Amer. J. Hum. Genet.* **1959**, *11*, 215-235.

- [253] Nowell, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* **1960**, 20, 462-466.
- [254] Schwenke, H.; von Baehr, R. Zum Wirkmechanismus von Phytohämagglutinin (PHA) auf Lymphozyten. *Allergie und Immunologie* **1972**, 18, 259-264.
- [255] Leavitt, R.D.; Felsted, R.L.; Bachur, N.R. Biological and biochemical properties of phaseolus vulgaris isolectins. *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 2961-2966.
- [256] Hamelryck, T.W.; Dao-Thi, M.H.; Poortmans, F.; Chrispeels, M.J.; Wyns, L.; Loris, R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 20479-20485.
- [257] Chilson, O.P.; Boylston, A.W.; Crumpton, M.J. Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *EMBO J.* **1984**, 3, 3239-3245.
- [258] Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. *Current Protoc. Immunol.* **2004**, Chapter 7, Unit 7.10.
- [259] Jacobson, K.A.; Hoffmann, C.; Cattabeni, F.; Abbracchio, M.P. Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling. *Apoptosis* **1999**, 4, 197-211.
- [260] Abbracchio, M.P. P1 and P2 receptors in cell growth and differentiation. *Drug Dev. Res.* **1996**, 39, 393-406.
- [261] Sandberg, G. Regulation of thymocyte proliferation by endogenous adenosine and adenosine deaminase. *Int. J. Immunopharmacol.* **1983**, 5, 259-265.
- [262] Snyder, F.F.; Mendelsohn, J.; Seegmiller, J.E. Adenosine metabolism in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **1976**, 58, 654-666.
- [263] Brady, T.G.; O'Donovan, C.I. A study of tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species. *Comp. Biochem. Physiol.* **1965**, 14, 101.
- [264] Conway, E.J.; Cooke, R. The deaminases of adenosine and adenilic acid in blood and tissues. *Biochem. J.* **1939**, 33, 479.
- [265] Adams, A.; Harkness, R.A. Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. *Clin. Exp. Immunol.* **1976**, 26, 647-649.
- [266] Giblett, E.R.; Anderson, J.E.; Cohen, F.; Pollara, B.; Meuwissen, H.J. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severe impaired cellular immunity. *Lancet* **1972**, ii, 1067-1069.

- [267] Gelfand, E.W.; Lee, J.J.; Dosch, H.M. Selective toxicity of purine deoxynucleosides for human lymphocyte growth and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 1998-2002.
- [268] Ruers, T.J.M.; Buurman, W.A.; van der Linden, C.J. 2' Deoxycoformycin and deoxyadenosine affect IL-2 production and IL-2 receptor expression of human T cells. *J. Immunol.* **1987**, *138*, 116-122.
- [269] Kameoka, J.; Tanaka, T.; Nojima, Y.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* **1993**, *261*, 466-469.
- [270] Apasov, S.; Sitkovsky, M.V. The extracellular versus intracellular mechanisms of inhibition of TCR-triggered activation in thymocytes by adenosine under conditions of inhibited adenosine deaminase. *Int. Immunol.* **1999**, *11*, 179-189.
- [271] Giblett, E.R.; Ammann, A.J.; Sandman, R.; Wara, D.W.; Diamond, L.K. Nucleotide phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. *Lancet* **1975**, *ii*, 1010-1013.
- [272] Edwards, N.L.; Magilavy, D.B.; Cassidy, J.T.; Fox, I.H. Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency in agammaglobulinemia. *Science* **1978**, *201*, 628-630.
- [273] Johnson, S.M.; North, M.E.; Asherson, G.L.; Allsop, J.; Watts, R.W.E.; Webster, A.D.B. Lymphocyte purine 5'-nucleotidase deficiency in primary hypogammaglobulinaemia. *Lancet* **1977**, *i*, 168-170.
- [274] Martin, M.; Centelles, J.J.; Huguet, J.; Echevarne, F.; Colomer, D.; Vives-Corrons, J.L.; Franco, R. Surface expression of adenosine deaminase in mitogen-stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **1993**, *93*, 286-291.
- [275] Martín, M.; Huguet, J.; Centelles, J.J.; Franco, R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex - possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4630-4643.
- [276] Dong, R.P.; Kameoka, J.; Hegen, M.; Tanaka, T.; Xu, Y.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J. Immunol.* **1996**, *156*, 1349-1355.
- [277] Ciruela, F.; Saura, C.; Canela, E.I.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.* **1996**, *380*, 219-223.
- [278] Herrera, C.; Casadó, V.; Ciruela, F.; Schofield, P.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Adenosine A_{2B} receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 127-134.

- [279] Kantamala, D.; Vongsakul, M.; Satayavivad, J. The *in vivo* and *in vitro* effects of caffeine on rat immune cells activities: B, T and NK cells. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **1990**, *8*, 77-82.
- [280] Horrigan, L.A.; Kelly, J.P.; Connor, T.J. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol. Ther.* **2006**, *111*, 877-892.
- [281] Dong, R.-P.; Umezawa, Y.; Ikushima, H.; Munakata, Y.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C. Different regulatory effects of pentoxifyllin on human T cell activation pathways. **1997**, *17*, 247-252.
- [282] Rosenthal, L.A.; Taub, D.D.; Moors, M.A.; Blank, K.J. Methylxanthine-induced inhibition of the antigen- and superantigen-specific activation of T and B lymphocytes. *Immunopharmacology* **1992**, *24*, 203-217.
- [283] Fredholm, B.B.; Battig, K.; Holmén, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 83-133.
- [284] Ukena, D.; Schudt, C.; Sybrecht, G.W. Adenosine receptor-blocking xanthines as inhibitors of phosphodiesterase isozymes. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 847-851.
- [285] Iwaz, J.; Lafont, S.; Cordier, G.; Revillard, J.P. Elevation of 3'5'-cyclic adenosine monophosphate alters CD3 and CD25 antigens expression in activated T lymphocytes. *J. Clin. Lab. Immunol.* **1989**, *29*, 85-89.
- [286] Wacholtz, M.C.; Minakuchi, R.; Lipsky, P.E. Characterization of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate mediated regulation of IL-2 production by T cells and Jurkat cells. *Cell. Immunol.* **1991**, *135*, 285-298.
- [287] Merighi, S.; Varani, K.; Gessi, S. Binding thermodynamics at the human A₃ adenosine receptor. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 157-161.
- [288] Feng, Y.; Wu, J.; Feng, X.; Tao, D.; Hu, J.; Qin, J.; Li, X.; Xiao, W.; Gardner, K.; Judge, S.I.V.; Li, Q.Q.; Gong, J. Timing of apoptosis onset depends on cell cycle progression in peripheral blood lymphocytes and lymphocytic leukemia cells. *Oncol. Rep.* **2007**, *17*, 1437-1444.
- [289] Weyler, S.; Fülle, F.; Diekmann, M.; Schumacher, B.; Hinz, S.; Klotz, K.N.; Müller, C.E. Improving potency, selectivity, and water solubility of adenosine A₁ receptor antagonists: Xanthines modified at position 3 and related pyrimido[1,2,3-*cd*]purinediones. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 891-902.
- [290] Sauer, R.; Maurinsh, J.; Reith, U.; Fülle, F.; Klotz, K.N.; Müller, C.E. Water-soluble phosphate prodrugs of 1-propargyl-8-styrylxanthine derivatives, a selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 440-448.

- [291] Colquhoun, A.; Newsholme, E.A. Inhibition of human tumour cell proliferation by analogues of adenosine. *Cell. Biochem. Funct.* **1997**, *15*, 135-139.
- [292] Mirabet, M.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Dipropylcyclopentylxanthine triggers apoptosis in Jurkat T cells by a receptor-independent mechanism. *Cell Death Differ.* **1997**, *4*, 639-646.
- [293] Barbieri, D.; Abbracchio, M.P.; Salvioli, S.; Monti, D.; Cossarizza, A.; Ceruti, S.; Brambilla, R.; Cattabeni, F.; Jacobson, K.A.; Franceschi, C. Apoptosis by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine and 2-chloro-adenosine in human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem. Int.* **1998**, *32*, 493-504.
- [294] Frydreich, I.; Dolezel, P.; Mlejnek, P. Induction of apoptosis by adenosine A₃ receptor agonist N⁶-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methylcarboxamide (IB-MECA) in human leukemia cells: a possible involvement of intracellular mechanism. *Purinergic Signal.* **2008**, *4* (Suppl.1), S198-S199.
- [295] Cohen, J.J. Apoptosis. *Immunol. Today* **1993**, *127*, 126-130.
- [296] Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J.C.; Arnaud, P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1600-1603.
- [297] Gillis, S.; Watson, J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules - V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med.* **1980**, *152*, 1709-1719.
- [298] Fredholm, B.B.; Jondal, M.; Nordstedt, C. The adenosine receptor mediated accumulation of cyclic AMP in Jurkat cells is enhanced by a lectin and by phorbol esters. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1987**, *145*, 344-349.
- [299] Sasaki, T.; Hasegawa-Sasaki, H. Molecular species of phosphatidylinositol, phosphatidic acid and diacylglycerol in a phytohemagglutinin-stimulated T-cell leukemia line. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *833*, 316-322.
- [300] Hölzl, J. Baldrianwurzel. *Zeitschrift für Phytotherapie* **1998**, *19*, 47-54.
- [301] Houghton, P.J. The scientific basis for the reputed activity of valerian. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 505-512.
- [302] Malva, J.O.; Santos, S.; Macedo, T. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extracts. *Neurotox. Res.* **2004**, *6*, 131-140.
- [303] Schellenberg, R.; Sauer, S.; Abourashed, E.A.; Koetter, U.; Brattström, A. The fixed combination of valerian and hops (Ze 91019) acts via a central adenosine mechanism. *Planta Med.* **2004**, *70*, 594-597.

- [304] Orth-Wagner, S.; Ressin, W.; Friedrich, I. Phytosedative for sleeping disorders containing extracts from valerian roots, hop grains and balm leaves. *Zeitschrift für Phytotherapie* **1995**, *16*, 147-156.
- [305] Volz, H.-P. Phytopharmaka als Mittel zur Schlafförderung. *ZaeFQ* **2001**, *95*, 33-34.
- [306] Balogh, A. Arzneimittel in der Therapie von Schlafstörungen - Übersicht. *ZaeFQ* **2001**, *95*, 11-16.
- [307] Leuschner, J.; Muller, J.; Rudmann, M. Characterization of the central nervous depressant activity of a commercially available valerian root extract. *Arzneim. Forsch. / Drug Res.* **1993**, *43*, 638-641.
- [308] Stevinson, C.; Ernst, E. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Med.* **2000**, *1*, 91-99.
- [309] Lindahl, O.; Lindwall, L. Double blind study of a valerian preparation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1989**, *32*, 1065-1066.
- [310] Vorbach, E.U.; Görtelmeyer, R.; Brünnig, J. Therapie von Insomnien. Wirksamkeit und Verträglichkeit eines Baldrianpräparates. *Psychopharmakotherapie* **1996**, *3*, 109-115.
- [311] Leathwood, R.D.; Chauvard, F.; Heck, E.; Munoz-Box, R. Aqueous extract of valerian root (*Valeriana officinalis* L.) improves sleep quality in man. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1982**, *17*, 65-71.
- [312] Donath, F.; Quispe, S.; Diefenbach, K.; Maurer, A.; Fietze, I.; Roots, I. Critical evaluation of the effect of a valerian extract on sleep structure and sleep quality. *Pharmacopsychiatry* **2000**, *33*, 47-53.
- [313] Bos, R.; Woerdenbag, H.J.; Pras, N. Determination of valepotriates. *J. Chromatogr. A* **2002**, *967*, 131-146.
- [314] Hendriks, H.; Bos, R. Die ätherischen Öle einiger Baldrianarten. *Dragoco. Report* **1984**, *1*, 3-17.
- [315] Rücker, G.; Tautges, J.; Sieck, H.; Wenzel, H.; Graf, E. Untersuchungen zur Isolierung und pharmakodynamischen Aktivität des Sesquiterpens Valeranon aus *Nardostachys jatmansii* DC. *Arzneim. Forsch. / Drug Res.* **1978**, *28*, 7-13.
- [316] Thies, P.W.; Funke, S. Nachweis und Isolierung von sedativ wirksamen Isovaleriansäureestern aus Wurzel und Rhizomen von verschiedenen Valeriana- und Kenthranthus-Arten. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *11*, 1155-1162.
- [317] Balduini, W.; Cattabeni, F. Displacement of [³H]-N⁶-cyclohexyladenosine binding to rat cortical membranes by a hydroalcoholic extract of *Valeriana officinalis*. *Med. Sci. Res.* **1989**, *17*, 639-640.

- [318] Müller, C.E.; Schumacher, B.; Brattström, A.; Abourashed, E.A.; Koetter, U. Interactions of valerian extracts and a fixed valerian-hop extract combination with adenosine receptors. *Life Sci.* **2002**, *71*, 1939-1949.
- [319] Basheer, R.; Strecker, R.E.; Thakkar, M.M.; McCarley, R.W. Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog. Neurobiol.* **2004**, *73*, 379-396.
- [320] Sichardt, K.; Vissienon, Z.; Koetter, U.; Brattström, A.; Nieber, K. Modulation of postsynaptic potentials in rat cortical neurons by valerian extracts macerated with different alcohols: involvement of adenosine A₁- and GABA_A-receptors. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 932-937.
- [321] Olah, M.E.; Stiles, G.L. Agonists and antagonists recognize different but overlapping populations of A₁ adenosine receptors: modulation of receptor number by MgCl₂, solubilization, and guanine nucleotides. *J. Neurochem.* **1990**, *55*, 1432-1438.
- [322] Gao, Z.G.; Kim, S.K.; Ijzerman, A.P.; Jacobson, K.A. Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 545-553.
- [323] Lorenzen, A.; Fuß, M.; Vogt, H.; Schwabe, U. Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A₁ adenosine receptor agonist in bovine brain membranes: stimulation of guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 115-123.
- [324] Gorzalka, S. Neuartige G-Protein-gekoppelte Purinrezeptoren: Funktionelle Charakterisierung nativer Adeninrezeptoren und Evaluation neuer Purinrezeptor-Liganden. Dissertation. *Universität Bonn*, **2006**.
- [325] Cheng, Y.; Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [326] Lacher, S.K.; Mayer, R.; Sichardt, K.; Nieber, K.; Müller, C.E. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors: identification of isovaltrate as an inverse agonist at A₁ receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 248-258.
- [327] Bigler, P. Modern homo- and heteronuclear 1D and 2D NMR experiments: a short overview. In: *NMR spectroscopy: processing strategies*, ISBN 978-3-527-29990-4, Wiley-VCH: Weinheim, **2000**, 60-79.
- [328] Thies, P.W. Zur Chemie der Valepotriate. 4. Mitteilung über die Wirkstoffe des Baldrians (on the chemistry of valepotriates. 4. Report on the bioactive constituents of valerian). *Deutsche Apotheker Zeitung* **1967**, *107*, 1411-1412.
- [329] Daly, J.W.; Hide, I.; Müller, C.E.; Shamim, M.T. Caffeine analogs: structure-activity relationships at adenosine receptors. *Pharmacology* **1991**, *42*, 309-321.

- [330] Müller, C.E.; Maurinsh, J.; Sauer, R. Binding of [3 H]MSX-2 (3-(3-hydroxypropyl)-7-methyl-8-(*m*-methoxystyryl)-1-propargylxanthine) to rat striatal membranes - a new, selective antagonist radioligand for A_{2A} adenosine receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *10*, 159-265.
- [331] Böyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest Suppl.* **1968**, *97*, 7-106.
- [332] Lohse, M.J.; Lenschow, V.; Schwabe, U. Interaction of barbiturates with adenosine receptors in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1984**, *326*, 69-74.
- [333] Bruns, R.F.; Lu, G.H.; Pugsley, T.A. Characterization of the A₂ receptor labeled by [3 H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 331-346.
- [334] Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
- [335] Markwell, M.A.K.; Haas, S.M.; Bieber, L.L.; Tolbert, N.E.A. A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **1978**, *87*, 206-210.
- [336] Klotz, K.N.; Lohse, M.J.; Schwabe, U.; Cristalli, G.; Vittori, S.; Grifantini, M. 2-Chloro-N⁶-[3 H]cyclopentyladenosine ([3 H]CCPA) - a high affinity agonist radioligand for A₁ adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1989**, *340*, 679-683.
- [337] Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P.S.; Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* **1992**, *10*, 413-417.
- [338] Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* **1993**, *11*, 1026-1030.
- [339] Bustin, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **2002**, *29*, 23-39.
- [340] Morrison, T.B.; Weis, J.J.; Wittwer, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* **1998**, *24*, 954-962.
- [341] Lossos, I.S.; Czerwinski, D.K.; Wechser, M.A.; Levy, R. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia* **2003**, *17*, 789-795.
- [342] Tichopad, A.; Didier, A.; Pfaffl, M.W. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol. Cell. Probes* **2004**, *18*, 45-50.

- [343] Weisser, M.; Haferlach, T.; Schoch, C.; Hiddemann, W.; Schnittger, S. The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2004**, *18*, 1551-1553.
- [344] Zhang, X.; Ding, L.; Sandford, A.J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **2005**, *6*, 4.
- [345] Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-C_t} method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408.
- [346] Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2003-2007.
- [347] Kaulich, M.; Streicher, F.; Mayer, R.; Müller, I.; Müller, C.E. Flavonoids-novel lead compounds for the development of P2Y₂ receptor antagonists. *Drug Dev.Res.* **2003**, *59*, 72-81.
- [348] Kassack, M.U.; Höfgen, B.; Lehmann, J.; Eckstein, N.; Quillan, M.; Sadée, W. Functional screening of G protein coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J. Biomol. Screening* **2002**, *7*, 233-246.
- [349] Lin, K.; Sadée, W.; Quillan, J.M. Rapid measurements of intracellular calcium using a fluorescence plate reader. *BioTechniques* **1999**, *26*, 318-326.

Danksagung

Ein großer Dank gilt an dieser Stelle allen denjenigen, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die mich auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben.

Besonders danke ich meinen Isolaborkolleginnen und –kollegen im Biozentrum und nun in den „neuen“ Laboren in Endenich, vor allem Anja Scheiff, Aliaa Abdelrahman, Dominik Thimm, Andreas Spinrath, Bernt Alsdorf, Benjamin Seibt, Markus Genau, Dieter Baumert, Dr. Meryem Köse, Manuela Dotten, Karen Schmeling, Julia Thomas, Sonja Hinz, Nicole Florin und Dr. Cristina Tilotta, für die heitere und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, trotz unerträglicher Hitze im Sommer im Biozentrum und so manchem (Lüftungs-) technischen Problem in Endenich, es hat immer sehr viel Spass gemacht mit Euch zu arbeiten, zu diskutieren und zu lachen! Sonja Hinz wünsche ich viel Glück und Erfolg für die weiterführende Bearbeitung dieses Themas!

Dieter Baumert und Markus Genau danke ich insbesondere für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die vielen Tips und Tricks, die mir vor allem in der Anfangsphase und während meines Qualifizierungsjahres die Laborarbeit sehr erleichtert haben. Auch ein großes Dankeschön für die alltäglichen, immer lustigen und kurzweiligen Kaffee- und Mittagspausen beim „Türken“, der eigentlich gar kein Türke war...

Nicole Florin danke ich für die perfekte Organisation des Laboralltages und für die Unterstützung bei allen kleinen oder größeren Problemen und Fragen, die während der Arbeit so anfielen. Ebenso danke ich Dr. Anke Schiedel für die vielen interessanten Diskussionen und Hilfestellungen rund um Fragen der Zellkultur und Molekularbiologie.

Frau Dr. Geun-Yung Ko und Frau Dr. Birgit Ohlendorf danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, die wir während Eurer Zeit bei uns im Labor hatten. Liebe Birgit, ich bin froh, dass wir es geschafft haben, uns immer noch ab und an bei einem Kaffee im guten alten Poppelsdorf zu treffen und ich wünsche Dir für Deinen weiteren Weg alles Gute! Liebe Gunny, die Ausflüge nach Luxemburg, auf den Drachenfels oder einfach

nur in Bonn waren immer eine willkommene Abwechslung zum Laboralltag, auch Dir wünsche ich für Deine Zukunft nur das Beste!

Frau Eva Hanfland und ihrem Team aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Blutspendedienst des Universitätsklinikums Bonn, danke ich für die stets freundliche Zusammenarbeit und die Erfüllung meiner zahlreichen „Sonderwünsche“ bei der Abholung der „Buffy coats“! Danke!

Carsten Linnemann und Anna Schurich aus dem Arbeitskreis von Prof. Percy Knolle, Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, danke ich für die tolle Unterstützung bei meinen FACS-Versuchen. Lieber Carsten, auch die Kaffeepausen in Poppelsdorf, die sich im Rahmen unseres Kooperationsprojektes zwecks Substanz- und Erfahrungsaustausch (diese mistige ADA...) ergeben haben, werde ich stets in guter Erinnerung behalten und ich wünsche Dir für Deine Promotionszeit in Amsterdam viel Erfolg und alles Gute!

Stefanie Zug und Marion Faigle aus dem Arbeitskreis von Prof. H. Eltzhig danke ich für die sehr schöne Zeit während meines Forschungsaufenthaltes an der Universität in Tübingen. Ihr habt mich in die Geheimnisse der Real-Time-PCR eingeführt und geduldig meine Fragen immer und immer wieder, zuerst persönlich und später per email, beantwortet. Liebe Steffi, insbesondere Dir vielen Dank für Deine Hilfe und Deine Geduld! An dieser Stelle auch ein Dank an Anke Bill, die mir bei weiterführenden Real-Time-PCR-Messungen immer mit Rat und Tat zur Seite stand und meine Platten immer noch irgendwo dazwischen schieben konnte, sodass ich nie lange auf meine Ergebnisse warten musste. Danke für alles!

Herrn Dr. Ralf Mayer danke ich für die gute Zusammenarbeit während unseres Baldrian-Projektes und auch für die schöne Woche, in der ich erste Einblicke in die mühevollen Arbeit eines Phytochemikers gewinnen durfte. Es hat sehr viel Spass gemacht, auch wenn ich eine Woche lang eine etwas gewöhnungsbedürftige Duftwolke mit mir herumgetragen habe! Vielen Dank!

Nach langjähriger Zusammenarbeit geht mein Dank auch an Prof. Daniela Gündisch, Dr. Romy Fleischer und an alle Assistentinnen und Assistenten des ehemals 5. und jetzt 6. Semester.

Auch den Mitgliedern des GRK 677, insbesondere Kerstin Neumann, Heiko Ullmann, Dr. Meryem Köse, Irina Buß, Stefan Kürpig, Christoph Eibl, Dr. Dirk Garmann und Björn Conrads danke ich für die interessanten Workshops und die schöne Zeit bei Stammtischen und gemeinsamen Kongressreisen.

Dr. Fabian Heisig, Dr. Meryem Köse, Frank Umbach, Heiko Meyer, Christiane Dannhauser, Dr. Claudia Riepe, Dr. Andreas Brunschweiler und Thomas Borrmann, Tim Deinet und Julia Thomas danke ich für die tolle Zeit im „Großraumbüro“, so viel Spass mit so vielen verrückten Leuten auf einem Haufen hatte ich selten! Vielen Dank dafür!

Auch meinen „neuen“ Bürokolleginnen und –kollegen, Melanie Knospe, Kirsten Loos, Benjamin Seibt und Manuela Dotten danke ich für die schöne – leider viel zu kurze – Zeit in Büro 409. Besonders bedanken möchte ich mich für die Unterstützung während des „Zusammenschreibens“, ihr habt mir bei jedem Problem weiterhelfen können (sei es, dass mein Auto nicht mehr angesprungen ist oder der Computer nicht das getan hat, was er sollte...) ihr habt Korrektur gelesen, mitgefiebert und mich wieder zum Lachen gebracht, wenn es sein musste! Danke für alles!

Dr. Markus Pietsch, Dr. Mark Thorand und Heiko Kiefer danke ich für die vielen schönen Wein-, Glühwein- und Cocktailabende, die wir uns zwischen Bonn und Aachen gegönnt haben. Es war immer sehr, sehr schön mit Euch und ich hoffe, dass wir diese Tradition auch weiterhin fortführen können, auch wenn es uns in die verschiedensten Ecken der Republik bzw. der Welt verschlägt. Danke für die schöne gemeinsame Zeit!

All meinen Freunden, vor allem Susanne Koch, Janine Pache, Michael Riebe, Dr. Florian Schilcher, Kristina Leßnau, Dennis Stöcken und Bärbl Meder mit Davide Navarro danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Wir haben so viele schöne Tage und Stunden zusammen verbracht, zusammen die Welt gesehen, zusammen gelacht und zusammen geweint, zusammen gefeiert und diskutiert und endlose Stunden am Telefon verbracht, es ist einfach schön, Euch zu haben! Liebe Suse, an dieser Stelle möchte ich

mich ganz herzlich für die letzten fast 20 Jahre unserer Freundschaft bedanken, in denen Du immer für mich da warst. Ich wünsche Dir von Herzen alles, alles Gute für die Zukunft, vor allem Kraft und Gesundheit – Du kannst es gebrauchen!

Meiner lieben Freundin Dr. Meryem Köse danke ich für ihre Unterstützung während meiner Promotionszeit. Liebe Mery, ich habe Dir viel zu verdanken, danke für die vielen tollen Gespräche im Labor, im Büro, beim Mittagessen oder Kaffee trinken in der Mensa oder beim „Türken“ sowie bei den unzähligen Autofahrten in und um Bonn. Danke für den Spass, den wir bei unseren Salsatanabenden, bei den verschiedensten GRK-Veranstaltungen und Kongressreisen hatten. Ein unendlich großes Dankeschön für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Hilfestellungen, Du hast dadurch großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit! Und nicht zuletzt möchte ich Dir für Deine Freundschaft danken. Liebe Mery, ich wünsche Dir und Deiner Tochter Tu çe eine wunderschöne Zeit in Sydney und eines ist sicher: wir bleiben Freunde, egal was kommt!

Ein großes Dankeschön geht auch an Familie Staufer, die mich immer unterstützt hat und mit denen ich sehr schöne Stunden erleben durfte, in denen ich mich immer sehr wohlfühlt habe und dabei Franken und die Oberpfalz kennen und lieben gelernt habe! Liebe Ute, auch Dir wünsche ich für Deine Gesundheit alles erdenklich Gute, Kraft und Durchhaltevermögen besonders in schwereren Stunden!

Von ganzem Herzen möchte ich nun meiner Familie - meinen Großeltern und besonders meinem Bruder Stefan und meinen Eltern - danken. Ihr habt mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer bedingungslos unterstützt, wart ausnahmslos für mich da, habt mir Mut gegeben und mir mit viel Geduld und Liebe den richtigen Weg gezeigt. Ihr habt das aus mir gemacht, was ich heute bin. Es lässt sich schwer in Worte fassen, wie dankbar ich Euch dafür bin!

Ebenso schwer lässt sich meine Liebe und Dankbarkeit für Hans-Jörg Staufer in Worte fassen. Ohne Deine liebevolle „computertechnische“ und vor allem persönliche Unterstützung während des Studiums und der Promotion wäre dies alles nicht möglich gewesen. Danke für die wunderschönen, gemeinsamen Jahre in Sigmaringen, Peking, Freiburg, Nürnberg und Bonn!

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Lacher, S.K.; Mayer, R.; Sichardt, K.; Nieber, K.; Müller, C.E. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors: identification of isovaltrate as an inverse agonist at A₁ receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 248-258.

Drabczynska, A.; Müller, C.E.; Lacher, S.K.; Schumacher, B.; Karolak-Wojciechowska, J.; Nasal, A.; Kawczak, P.; Yuzlenko, O.; Pekala, E.; Kiec-Kononowicz, K. Synthesis and biological activity of tricyclic aryloimidazo-, pyrimido-, and diazepinopurinediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7258-7281.

Massip, S.; Guillon, J.; Bertarelli, D.; Bosc, J.J.; Léger, J.M.; Lacher, S.; Bontemps, C.; Müller, C.E.; Jarry, C. Synthesis and preliminary evaluation of new 1- and 3-[1-(2-hydroxy-3-phenoxypropyl)]xanthines from 2-amino-2-oxazolines as potential A₁ and A_{2A} adenosine receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2697-2719.

Poster

Lacher, S.K.; Mayer, R.; Müller, C.E. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors. *DFG-Berichtskolloquium, GRK677, Bonn, Deutschland*, 18. Januar 2005.

Ohlendorf, B.; Nett, M.; Lacher, S.K.; Kehraus, S.; Müller, C.E.; König, G.M. Secondary metabolites of myxobacteria and their interaction with adenosine receptors. *4th European Conference on marine natural products, Paris, Frankreich*, 12.-16. September 2005.

Lacher, S.K.; Mayer, R.; Müller, C.E. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors. *First Joint Italian-German Purine Club Meeting, Chieti, Italien*, 18.-20. September 2005.

Lacher, S.K.; Mayer, R.; Müller, C.E. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Mainz, Deutschland*, 05.-08. Oktober 2005.

Lacher, S.K.; Mayer, R.; Müller, C.E. Bioassay-guided fractionation of hydrophilic and lipophilic valerian extracts: identification of novel lead structures for the development of adenosine receptor agonists and inverse agonists. *Minisymposium des Graduiertenkollegs GRK677 – Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung, Bonn, Deutschland*, 30. März 2006.

Lacher, S.K.; Müller, C.E. Search for non-adenosine nucleoside receptors. *Dokortagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Nürnberg-Heroldsberg, Deutschland*, 06.-08. September 2006.

Lacher, S.K.; Müller, C.E. Search for non-adenosine nucleoside receptors. *International Symposium of the Graduate College GRK677 – Structure and molecular interaction as a basis of drug action, Bonn, Deutschland*, 25.-27. September 2006.

Lacher, S.K.; Müller, C.E. Effects of adenosine receptor modulation on proliferation of T lymphocytes. *Gemeinsame Tagung der themenverwandten Graduiertenkollegs GRK677 (Uni Bonn) und GRK760 (Uni Regensburg), Nürnberg, Deutschland*, 08.-10. Oktober 2007.

Lacher, S.K.; Müller, C.E. Effects of adenosine receptor modulation on proliferation of T lymphocytes. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Erlangen, Deutschland*, 10.-13. Oktober 2007.

Lacher, S.K.; Müller, C.E. Adenosine receptors on human T lymphocytes and Jurkat T cells. *Purines 2008 – 6th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides, Kopenhagen, Dänemark*, 29. Juni-02. Juli 2008.

Lacher, S.K.; Müller, C.E. Adenosine receptors on human T lymphocytes and Jurkat T cells. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Bonn, Deutschland*, 08.-11. Oktober 2008. Mitglied des Organisationsteams.